



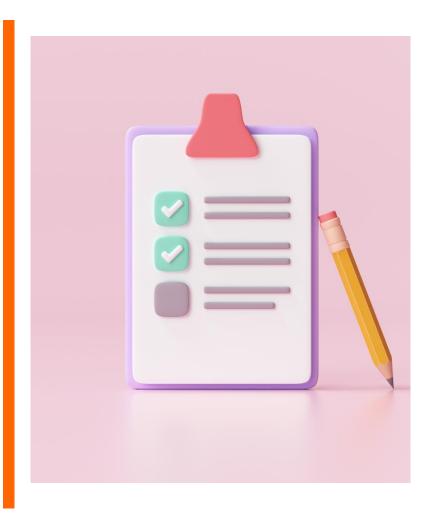




Sandra Nunes

Licenciatura em Nutrição e Engenharia Alimentar Responsável Técnica do Laboratório de Microbiologia da SGS Portugal





Conteudo Programático:

- Enquadramento normativo;
- ✓ Conceitos associados;
- ✓ Identificação das fontes de Incerteza;
- Documentos e registos associados;
- ✓ Cálculo da Incerteza

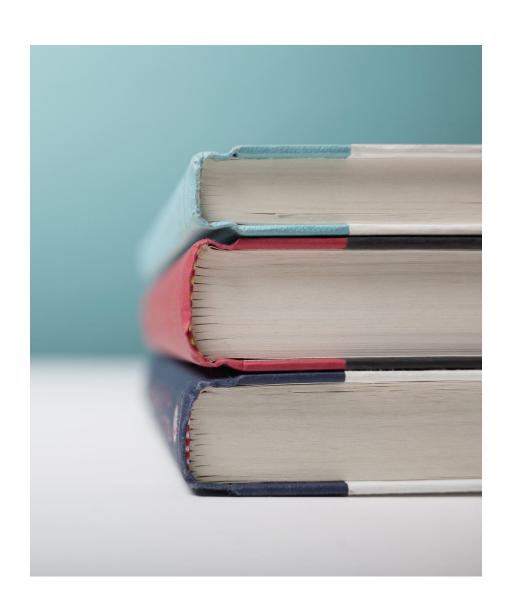




Objectivo:

No final da ação de formação os participantes ficarão com os conhecimentos necessários para a implementação NP EN ISO/IEC 17025, nomeadamente do ponto **7.6 – Avaliação da Incerteza da Medição**, para dar resposta às diferentes áreas e matrizes (Alimentos e Águas de Consumo).





ENQUADRAMENTO NORMATIVO



Norma Portuguesa

EN ISO/IEC 17025 2018

Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração (ISO/IEC 17025:2017)

Exigences générales concernant la compétence des aboratoires d'étalonnages et d'essais (ISO/IEC 17025:2017)

General requirements for the competenc of testing and calibration laboratories (ISO/IEC 17025:2017)

ELABORAÇÃO

Termo de Homologação n.º 144/2018, de 2018-07-16 A presente Norma resulta da revisão da

CT 147 (APO)

3* EDIÇÃO 2018-09-17

Requisito 7.6 – Avaliação da Incerteza da Medição

- Um laboratório deve identificar as contribuições para a incerteza da medição.
- Um laboratório que realiza ensaios deve avaliar a incerteza de medição.



2 normas de suporte ao cálculo da Incerteza de Medição:

INTERNATIONAL STANDARD ISO 19036

> First edition 2019-10

Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Estimation de l'incertitude de mesure pour les déterminations quantitatives

Zaragatoas

Alimentos

INTERNATIONAL STANDARD

ISO 29201

> First edition 2012-01-15

> > **Guia RELACRE**

Water quality — The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods

Qualité de l'eau - Variabilité des résultats d'essais et incertitude de mesure des méthodes d'énumération microbienne

Águas









CONCEITOS



Incerteza da Medição



Parâmetro, associado ao resultado da medição, que caracteriza a dispersão de valores que podem ser atribuídos ao mensurando.

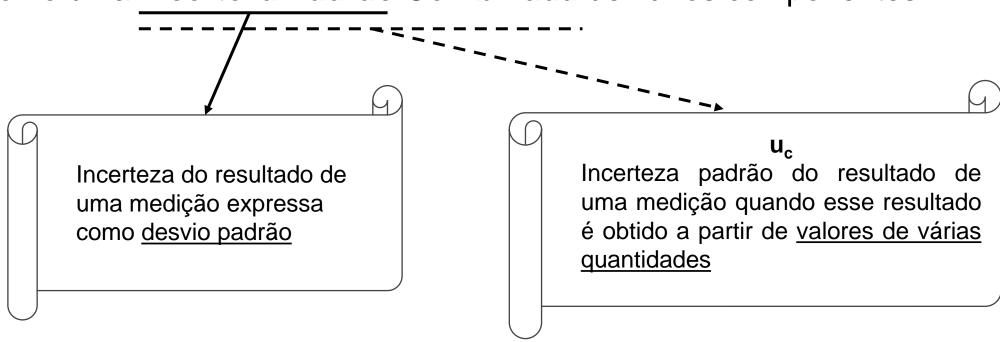
(ISO/IEC Guia 98-3:2008)

Incerteza em Microbiologia

Parâmetro, associado ao resultado da CONTAGEM DE MICRORGANISMOS, que caracteriza a dispersão de valores que podem ser atribuídos à CONTAGEM.



A Incerteza de um Resultado – **Incerteza da Medição** – é expressa como uma **Incerteza Padrão Combinada** de vários componentes.





A Incerteza de um Resultado – **Incerteza da Medição** – é expressa como uma **Incerteza Padrão Combinada** de vários componentes.

- Variância Operacional / Incerteza Técnica (toma da amostra, meios de cultura, equipamentos);
- Incerteza da Matriz
- Incerteza da Distribuição Incerteza da distribuição (distribuição dos microrganismos da amostra)



Incerteza Técnica ou

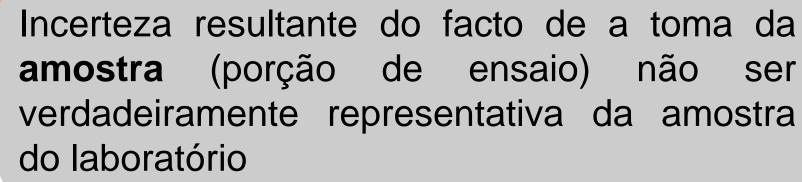
Variância Operacional Incerteza resultante da variabilidade operacional associada às etapas técnicas do **método de ensaio**. É calculada através do desvio padrão da reprodutibilidade do resultado.



- a) Variabilidade da pesagem, mistura e diluição da toma da amostra (porção para ensaio) retirada da amostra de laboratório para preparara a suspensão inicial e as diluições subsequentes;
- o) Variabilidade da incubação e dos meios de cultura.



Incerteza da Matriz



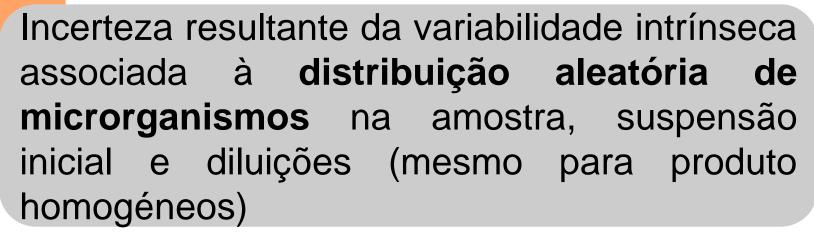


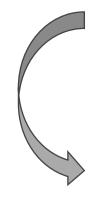
No caso dos alimentos, pode ser estimada por tipo de matriz.

- Líquidos (leite)
- Solidos bem misturados (ex: carne picada, peixe)
- Sólidos Pequenos (ex: salada de fruta)
- Outros sólidos



Incerteza da Distribuição





É estimatimada matematicamente e existem 3 tipos.

- Para técnicas de contagem de colonias
 - Incerteza de Poisson
 - Incerteza de confirmação
- Para técnicas NMP
 - Incerteza NMP



Incerteza expandida

Quantidade de define um intervalo de um resultados de uma medição, no qual é esperado que se inclua uma grande fracção da distribuição dos valores que podem ser atribuídos ao mensurando.





Fontes de Incerteza



Amostra

- Técnico de Amostragem
- Método de amostragem

Análise

- Preparação da suspensão inicial
- Inoculação
- Incubação
- Filtração da amostra

Resultado

- Testes de confirmação
- Contagem de colonias





Documentação e Registos



- O laboratório deverá documentar:
- ✓ o método de Cálculo da Estimativa da Incertezas;
- ✓ o Levantamento das Fontes de Incerteza

- O laboratório deverá evidenciar através de <u>registos</u>:
- ✓ o Cálculo da Estimativa da Incertezas, e suas componentes (incerteza da matriz, técnica).



INTERVALO







Cálculo de Estimativa de Incerteza





ISO 29201

> First edition 2012-01-15

Water quality — The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods

Qualité de l'eau - Variabilité des résultats d'essais et incertitude de mesure des méthodes d'énumération microbienne

AGUAS DE CONSUMO HUMANO

A <u>incerteza combinada</u> é obtida através da combinação da <u>variância operacional</u> e da variância intrínseca (variância da distribuição)

Variância Operacional (u_0) – Incerteza do Método/Técnica

Variância Intrínseca/distribuição (u_d) – Incerteza da Distribuição

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{0,rel}^2 + u_{d,rel}^2}$$





Cálculo da Variância Operacional (u_o), da Reprodutibilidade (u_R) e da Variância da Distribuição (u_d)

Obtida através da seguinte formula:

$$u_0^2 = u_R^2 - u_d^2$$

 u_R – Variância da Reprodutibilidade intralaboratorial / Incerteza padrão da Reprodutibilidade intralaboratorial

 u_d – Variabilidade Intrínseca (incerteza padrão da distribuição)

$$u_R^2 = \frac{(\log D1 - \log D2)^2}{2}$$

$$u_d^2 = \dfrac{0,1886}{m cute{dia} \ n.^{\ 0} \ de \ col\'onias}$$

Calcular a média dos valores obtidos (2 analistas em 20 amostras) para obtenção do valor da variância operacional a usar no cálculo da Incerteza Combinada





Amostra n.º	Data.	Técnico (cl)	Técnico (c2)	Resultados				Variância de reprodutibilidade (U ² ir)	Variância da distribuição (u²₄)		Variância operacional (u² _u)
				n _{e1}	n _{e2}	Lg n _{et}	Lgnez	(Lg nc1-Lg nc2)*2/2	média (nc1: nc2)	(0,1886)/n _e	(u² ₁₀ -u² _d)
I	23-mar-15			5	8	0,6990	0,9031	0,0208	7	0,0290	-0,0082
2	24-mar-15			15	Ш	1,1761	1,0414	0,0091	13	0,0145	-0,0054
3	25-mar-15			Ш	19	1,0414	1,2788	0,0282	15	0,0126	0,0156
4	20-abr-15			21	39	1,3222	1,5911	0,0361	30	0,0063	0,0299
5	27-abr-15			68	45	1,8325	1,6532	0,0161	57	0,0033	0,0127
6	27-abr-15			151	203	2,1790	2,3075	0,0093	177	1100,0	0,0072
								0,0198		0,0111	0,0086

Valor da Estimativa da Incerteza Operacional

A estimativa das incertezas é expressa como Incerteza Padrão Relativa ou %. Para comparar com os valores da u_0^2 com as incertezas em valores relativos, o seu valor deve ser convertido em escala relativa multiplicando por 5,302

No exemplo,
$$u_{0,rel}^2 = 5,302 \times 0,0086 = \textbf{0,0456}$$

 Incerteza Operacional Relativa $u_{0,rel} = \sqrt{0,0456} = 0,208 \approx \textbf{21}\%$



Alimentos

INTERNATIONAL STANDARD ISO 19036

> First edition 2019-10

Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Estimation de l'incertitude de mesure pour les déterminations quantitatives

A <u>incerteza</u> dos resultados dos ensaios resulta da <u>combinação</u> de, pelo menos, 3 componentes:

Variância Operacional (u_0) – Incerteza do Método/Técnica

Incerteza da Matriz (u_{matriz})

 $\frac{\text{Variância Intrínseca/distribuição}}{\text{Distribuição}} \left(u_d\right) - \text{Incerteza da} \\ u_{c,rel} = \sqrt{u_{0,rel}^2 + u_{d,rel}^2}$



Cálculo da Variância Operacional (u_o) – INCERTEZA TÉCNICA

O cálculo é feito através do cálculo do Desvio Padrão da Reprodutibilidade (SIR)

$$s_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2|n} \sum_{i=1}^{n} (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

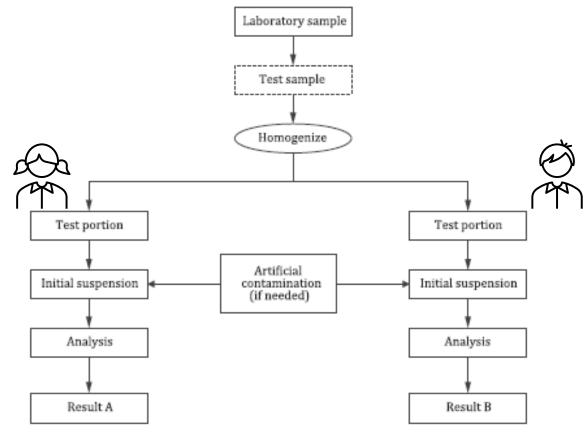
 y_{iA} e y_{iB} – n.º de colónias obtidos transformados em \log_{10} ufc



Cálculo da Variância Operacional (u_o) – INCERTEZA TÉCNICA

Protocolo:

- Executar o protocolo para cada método de ensaio;
- Escolher amostras homogéneas ou bem homogeneizadas;
- Analisar pelo menos 10 amostras e obter pelo menos 2 resultados aceitáveis para cada amostra (valores entre 30 ufc/placa e o limite de colónias contadas por placa (150 ou 300).





Cálculo da Variância da matriz (u_{matriz}) – INCERTEZA MATRIZ

O cálculo é feito através do cálculo do Desvio Padrão da Reprodutibilidade (SIR)

$$s_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2|n} \sum_{i=1}^{n} (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

 y_{iA} e y_{iB} – n.º de colónias obtidos transformados em \log_{10} ufc



Cálculo da Variância matriz (u_{Matriz}) – INCERTEZA MATRIZ

A saber:

Se o matriz for homogéneo, como os líquidos e os sólidos bem mistrurados, espera-se um valor de incerteza pequeno;

Assim, e de acordo com o ponto 6.2 da ISO 19036, o valor estimado para a incerteza da matriz associada a

- Amostras homogéneas bem misturadas
- Amostras líquidas



Falta calcular a U associada às matrizes, sólidos pequenos e outros sólidos...

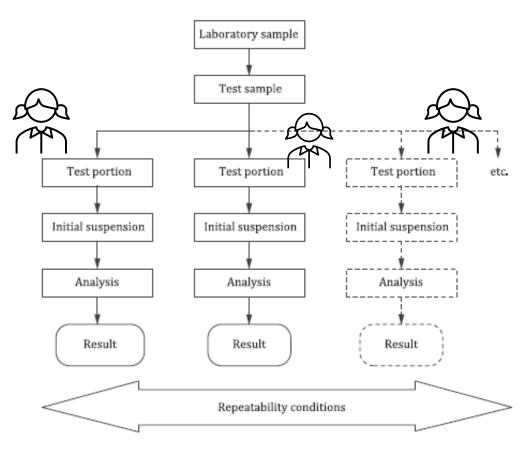


Cálculo da Variância matriz (u_{Matriz}) – INCERTEZA MATRIZ

Pode ser estimada como o desvio padrão da repetibilidade dentro da amostra de laboratório, <u>analisando várias tomas em condições de repetibilidade</u> de uma ou mais amostras de laboratório, usando o desenho experimental



Mesmo analista analisa em duplicado, triplicado...

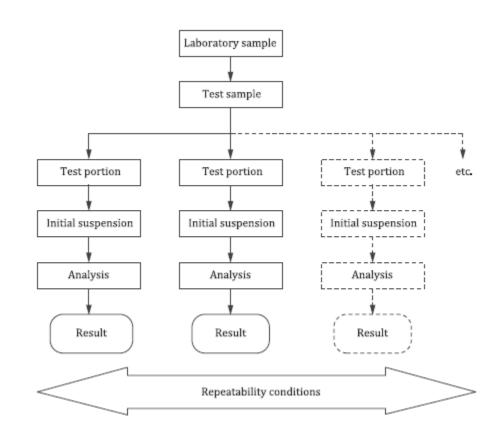




Cálculo da Variância matriz (u_{Matriz}) – INCERTEZA MATRIZ

Protocolo:

- Executar o protocolo para cada método de ensaio;
- Escolher amostras homogéneas ou bem homogeneizadas;
- Analisar pelo menos 10 amostras e obter pelo menos 2 resultados aceitáveis para cada amostra (valores entre 30 ufc/placa e o limite de colónias contadas por placa (150 ou 300).





Cálculo da Variância matriz (u_{Matriz}) – INCERTEZA MATRIZ

Notas importantes:

Usar <u>amostras naturalmente contaminadas</u>, pois é improvável que a contaminação artificial reflita a incerteza real da matriz.

Como a incerteza da matriz é considerada independente do parâmetro e do método de teste usado, devem-se <u>escolher parâmetros para os quais é provável que amostras naturalmente contaminadas</u> sejam encontradas.

Os <u>valores de incerteza da matriz obtidos num laboratório podem ser</u> <u>usados por outro laboratório</u> para amostras de laboratório que se espera terem uma incerteza de matriz semelhante.



Cálculo da Variância da Distribuição (u_d) – INCERTEZA DISTRIBUIÇÃO

Mesmo para material homogéneo, há componentes mínimos de incerteza que surgem da distribuição aleatória de microrganismos nas amostras, geralmente representada pela distribuição de Poisson.

$$u_{\text{Poisson}} = \frac{1/\ln(10)}{\sqrt{\sum C}} = \frac{0,4343}{\sqrt{\sum C}}$$

C − n.º de colónias obtidos em ufo



Cálculo da Variância da Confirmação (u_{conf}) – INCERTEZA CONFIRMAÇÃO

Para os ensaios em que é necessária a confirmação de colonias suspeitas, torna-se necessário, calcular a sua variância.

$$u_{\text{conf}} = \frac{1}{2,303} \sqrt{\frac{\left(n_{\text{c}} + 0.5\right)\left(n_{\text{p}} - n_{\text{c}} + 0.5\right)n_{\text{p}}^{2}}{\left(n_{\text{p}} + 1\right)^{2}\left(n_{\text{p}} + 2\right)n_{\text{c}}^{2}}}$$

nc – n.º de colónias confirmadas np – n.º de colónias presumíveis



As componentes da Incerteza Combinada em ALIMENTOS

Incerteza da Matriz

Incerteza técnica ou Variância Operacional

Incerteza da Distribuição

Incerteza da Confirmação

$$s_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2|n} \sum_{i=1}^{n} (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

$$u_{\text{Poisson}} = \frac{1/\ln(10)}{\sqrt{\sum C}} = \frac{0,4343}{\sqrt{\sum C}}$$

$$u_{\text{conf}} = \frac{1}{2,303} \sqrt{\frac{\left(n_{\text{c}} + 0.5\right) \left(n_{\text{p}} - n_{\text{c}} + 0.5\right) n_{\text{p}}^{2}}{\left(n_{\text{p}} + 1\right)^{2} \left(n_{\text{p}} + 2\right) n_{\text{c}}^{2}}}$$



A Incerteza Combinada

Colony-count methods, without partial confirmation:
$$u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2 + u_{\text{Poisson}}^2}$$

Colony-count methods, with partial confirmation:
$$u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2 + u_{\text{Poisson}}^2 + u_{\text{conf}}^2}$$

A incerteza combinada poderá ser expandida para um nível de confiança de 95%, aplicando o fator K=2

$$U = 2 uc (y)$$



A Avaliação da Incerteza de Medição em Ensaios Microbiológicos

A incerteza técnica só volta a ser calculada se houver mudança de

INTERNATIONAL ISO STANDARD 9308-1

Third edition 2014-09-15

Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria —

Part 1:

Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora

Qualité de l'eau — Dénombrement des Escherichia coli et des bactéries coliformes —

Partie 1: Méthode par filtration sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries

INTERNATIONAL ISO STANDARD 19036

> First edition 2019-10

Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Estimation de l'incertitude de mesure pour les déterminations quantitatives







A Incerteza na Avaliação de resultados analíticos

2.2. Expressão de resultados com Incerteza

- A incerteza deve ser reportada na mesma unidade que o resultado do ensaio e deve ser reportada expandida.
- É expressa como:
 - ☐ Intervalo de escala log10
 - □ Valores naturais (ufc/g ou ufc/ml)

resultado log_{10} com $\pm U$: y \pm U log_{10} ufc / g ou ufc / ml

• Ex: 5,00 ± 0,31 log₁₀ ufc / g

resultado log_{10} + intervalo: y log_{10} ufc/g ou ufc/ml [y - U; y + U]

• Ex: 5,00 log₁₀ ufc / g [4,69; 5,31]

resultado ufc + intervalo de U: x ufc/g ou ml [10 $^{y-U}$; 10 $^{y+U}$];

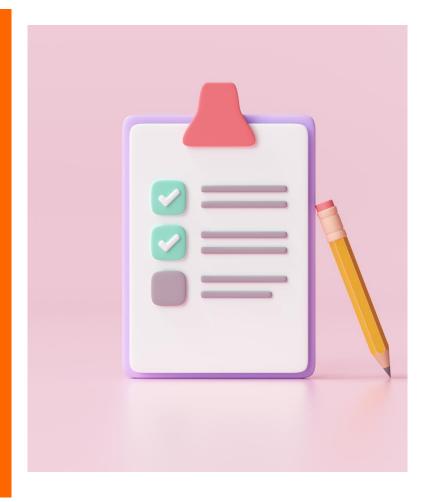
• Ex: 1.0×10^5 ufc / g $[4.9 \times 10^4; 2.0 \times 10^5]$



INTERVALO



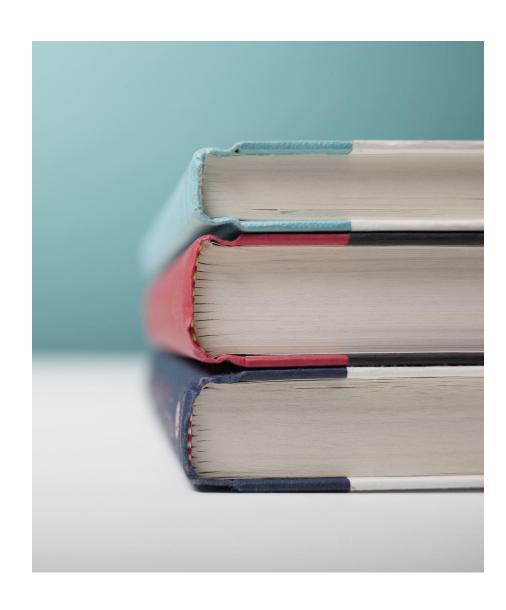




Conteudo Programático:

- Enquadramento normativo;
- ✓ Conceitos, Documentos e Registos associados;
- ✓ Monitorização e Validação dos Resultados;
- ✓ Apresentação de Resultados;
- ✓ Declarações de Conformidade
- ✓ Opiniões e Interpretações
- Emendas





ENQUADRAMENTO NORMATIVO



Norma Portuguesa

NP EN ISO/IEC 17025 2018

Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração (ISO/IEC 17025:2017)

Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais (ISO/IEC 17025:2017)

General requirements for the competenc of testing and calibration laboratories (ISO/IEC 17025:2017)

ICS 03.120.20

RRESPONDÊNCIA

HOMOLOGAÇÃO

Termo de Homologação n.º 144/2018, de 2018-07-16 A presente Norma resulta da revisão da NP EN ISO/IEC 17025:2005 (Ed. 2)

ELABORAÇÃO CT 147 (APO)

3* EDIÇÃO 2018-09-17

CÓDIGO DE PREÇO

Requisito 7.7 – Assegurar a validade dos resultados

 Um laboratório deve participar em Ensaios de Aptidão e/ou Comparações Interlaboratoriais.

 Assim como deve monitorizar os dados obtidos.





Conceitos, Documentos e Registos



Como é possível assegurar a validade dos resultados obtidos?

O laboratório deverá elaborar um **procedimento** que descreva a **metodologia implementada para a monitorização da validade dos resultados**.



Deve ser planeada e deve incluir:

- ✓ Uso de materiais de referência ou materiais de CQ;
- ✓ Verificações do funcionamento do equipamento de medição e ensaio;
- ✓ Ensaios em replicado;
- ✓ Ensaio de amostras cegas

Controlo dos ensaios



Como é possível assegurar a validade dos resultados obtidos?

EXEMPLOS:



Controlo Positivo

Inoculação de amostra com estirpe Incubação nas mesmas condições da amostra

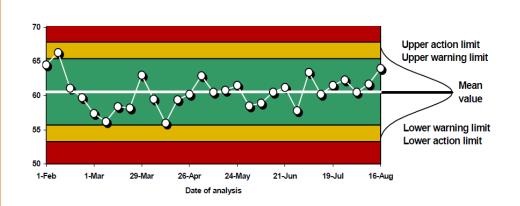
Critério de Aceitação

Colonias características e testes serológicos ou bioquímicos positivos



Como é possível assegurar a validade dos resultados obtidos?

EXEMPLOS:



Cartas de Controlo



- Ferramenta muito util no CQ diário;
- Permitem definir Limites de Aviso de Limites de Ação
- A colocação de novos dados permite saber se um método está dentro ou fora de controlo.



Norma Portuguesa

NP EN ISO/IEC 17025 2018

Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração (ISO/IEC 17025:2017)

Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essa is (ISO/IEC 17025:2017)

General requirements for the competenc of testing and calibration laboratories (ISO/IEC 17025:2017)

ICS 03.120.20 HOM Term A pre-

HOMOLOGAÇÃO

Termo de Homologação n.º 144/2018, de 2018-07-16 A presente Norme resulta da revisão da NP EN ISO/IEC 17025:2005 (Ed. 2)

ELABORAÇÃO CT 147 (APO)

3* EDIÇÃO 2018-09-17

CÓDIGO DE PREÇO

Requisito 7.8 – Apresentação de resultados

- Os resultados devem ser revistos e autorizados antes de serem emitidos.
- Devem ser apresentados de forma exata, clara e objectiva. Normalmente sob o formato de relatório.
- Devem incluir toda a informação acordada com o cliente e necessária à interpretação dos resultados.
- Os relatórios são REGISTOS TÉCNICOS!

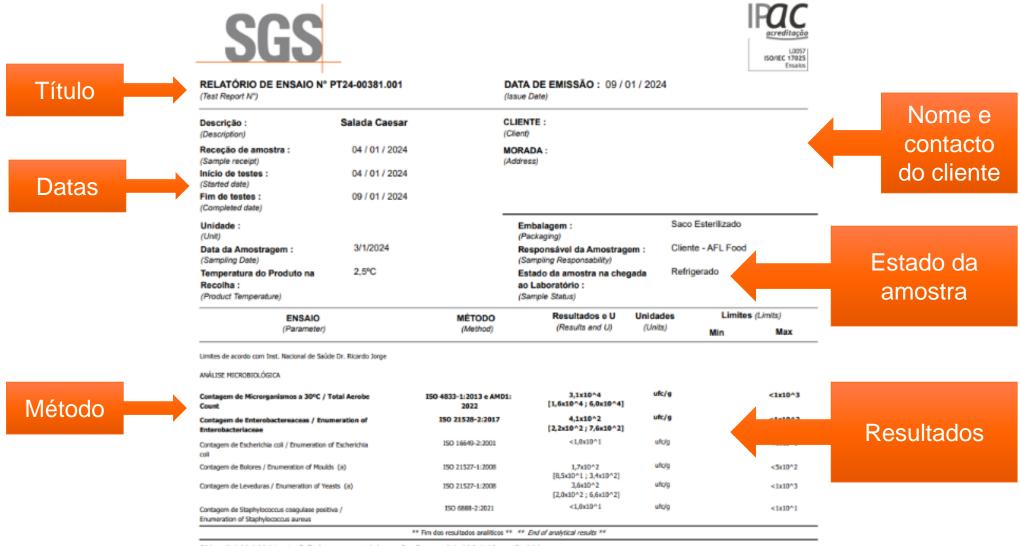




Requisito 7.8 – Apresentação de resultados

- Os resultados devem ser revistos e autorizados antes de serem emitidos.
- Devem ser apresentados de forma exata, clara e objectiva. Normalmente sob o formato de relatório.
- Devem incluir toda a informação acordada com o cliente e necessária à interpretação dos resultados.
- Os relatórios são REGISTOS TÉCNICOS!





O(s) resultado(s) da(s) determinação(ões) que se encontra(m) a **negrito** não cumpre(m) o(s) limite(s) especificado(s) (The result(s) of the determination(s) is **bold** do not meet the specified limit(s))

Avaliação de confermidade face ao Regulamento(s) / especificação(ões) indicados e de acordo com regra de decisão previamente acordada com o cliente: a incerteza de medição não é considerada na avaliação de conformidade

(Conformity assessment against the Regulation(s) / specification(s) indicated and with decision rule previously agreed with the client; the uncertainty of determination is not considered in the conformity assessment)





Outros dados dos relatórios

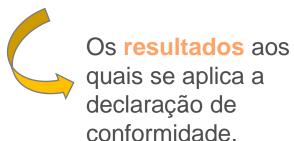


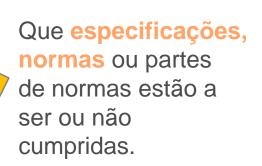
- ✓ Nome e morada do laboratório;
- ✓ Declaração em como os resultados se referem apenas ao item ensaio
- ✓ Identificação de quem aprova/autoriza os resultados;
- ✓ Identificação clara dos resultados quando emitidos por fornecedores externos;
- Declaração de conformidade, Opiniões e Interpretações (opcional)

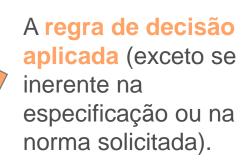


As Declarações de Conformidade e a NP EN ISO / IEC 17025

Um relatório/boletim de ensaio deverá apresentar, informação quanto a:



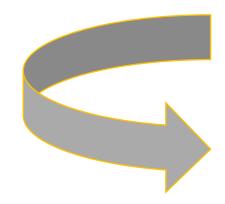






A Declaração de Conformidade e as Incertezas

✓ A apresentação, ou não, de declarações de conformidade, deve ser separada da apresentação das incertezas.



Regra de decisão - Regra que descreve como a incerteza na medição é considerada quando se declara a conformidade com um requisito especificado.



A Declaração de Conformidade e as Incertezas

✓ Quando é solicitada pelo cliente, a emissão de uma declaração de conformidade face a uma especificação ou norma, então:



Regra de decisão – deve estar perfeitamente definida, comunicada e acordada com o cliente a não ser que seja inerente à norma ou especificação solicitada.



As emendas nos relatórios

Quando um relatório já emitido necessita ser emendado e reenviado, a alteração deve ser claramente identificada no relatório e sempre que possível incluir o motivo da alteração



Deve sempre ser emitido um novo relatório (nova versão) com essa mesma indicação, como por exemplo: "EMENDA AO RELATÓRIO"



As emendas nos relatórios



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº PT23-36589.001 / 1 DATA DE EMISSÃO: 03/08/2023

O presente Relatorio de Ensalo anula e substitul o Relatorio de Ensalo com o mesmo numero emitido anteriormente.

(The present Report cancels and replaces the one with same number previously issued.)

Descrição : (Description)

Receção de amostra :

(Sample receipt) Inicio de tectes : (Started date)

Fim de testes : (Completed date) Embalagem :

Saco Plástico

(Packaging) Responsável da Amostragem :

(Sampling Responsability)

Peco / Capacidade : (Weight / Capacity)

PEI/2023/05703

05 / 07 / 2023 05 / 07 / 2023

03 / 08 / 2023

CLIENTE

84g

ENSAIO

(Parameter)

(Address)

CLIENTE:

(Client)

MORADA:

Referência do Cliente :

Selo: 2141179

Não Refrigerado

UGRO_JUNHO2023

(Client Reference) Lote:

(Lot) Estado da amostra na ohegada

ao Laboratório : (Sample Status)

Resultados Unidades (Results) (Units)

ANÁLISE MICRORIOLÓGICA

monocytogenes

Pesquisa de Escherichia coli 0157917 / Detection of Excharichia coli 0057:107

Pesquisa de Listeria monocytogenes / Detection of Listeria

VIDAS UP E.coli O157 APNOR 600 12/25-05/09

MÉTODO

(Method)

Vidas LMC2 - AFNOR BIO 12/9-7/02 c/ confirmação resultados positivos de acordo

c/Método ELFA - Enzyme Linked Fluorescent Assay

Perquisa de Shigella / Detection of Shigella 150 21567:2004

Não Debetado

25 g

** Firm doe resultados analíticos ** ** End of analítical results **

Os resultados aplicam-se à amostra conforme rececionada. (Results apply to the sample as received.

Ensaios malizados nas instalações permanentes do Laboratório esceto: Colheita amostra, ensaios contratados ou realizados em campo, devidamente identificados. (Tests performed in the personnent installations of the Laboratory except: Sample collection, bets contracted or carried out in the field, duly identified)

COMENTÁRIOS: (Comments)

Emenda: Alteração do resultado da Pesquisa de Listeria.



A Incerteza na Avaliação de resultados analíticos



Validade dos resultados e Apresentação dos mesmos



