

GUIA PARA A ESTIMATIVA DE INCERTEZA EM ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

OGC005 • 2006-01-31

ÍNDICE

1	Objectivo	2
2	Introdução	2
3	Referências Bibliográficas	2
4	Definições	2
5	Classificação de matrizes	3
6	Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade	3
	6.1 Desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial	3
	6.2 Desvio padrão da reprodutibilidade do método proveniente de um estudo interlaboratorial	5
	6.3 Desvio padrão da reprodutibilidade do método proveniente de um estudo interlaboratorial de avaliação de desempenho	6
7	Expressão da medida da incerteza	6

Total de Páginas: 6

1 Objectivo

Este guia tem como objectivo apoiar os laboratórios de ensaios microbiológicos (água e alimentos) na quantificação da incerteza da medição apresentando as abordagens mais usadas nesta quantificação. Este guia deve servir de base à harmonização da avaliação da implementação do requisito técnico “Estimativa da incerteza da medição” (5.4.6) da Norma ISO/IEC 17025. Neste documento não são apresentados, de forma exaustiva os conceitos básicos da quantificação da incerteza da medição, visto que estes estão descritos, em diversos documentos ou suas traduções. Ao longo do guia são apresentados alguns exemplos de aplicação.

2 Introdução

Os Laboratórios acreditados devem estimar a incerteza dos ensaios, mas esta deve ser reportada apenas quando relevante. A estimativa da incerteza apenas permite apreciar a confiança a atribuir aos resultados dos ensaios, não devendo ser relacionada com a competência do laboratório.

O cálculo da incerteza em ensaios microbiológicos deverá ser efectuado através da abordagem global conforme o recomendado no documento ISO TS 19036.

A abordagem global, estimativa tipo A, baseia-se na estimativa experimental do desvio padrão da reprodutibilidade do resultado final do ensaio de medição. Este desvio padrão corresponde a uma incerteza padrão combinada. Assim, a abordagem global baseada na variabilidade total do processo analítico, cujo final é o resultado do ensaio, inclui o viés “*bias*” (componente sistemática) e a precisão (componente aleatória).

O desvio padrão da reprodutibilidade deve ser calculado em cada método quantitativo que o laboratório utilize em rotina, para cada tipo de microrganismo ou grupo consistente de microrganismos (ex. coliformes) e para cada matriz, ou para um grupo consistente de matrizes.

Os laboratórios que efectuem ensaios microbiológicos têm ou podem obter resultados de ensaio em replicado, para as amostras analisadas, preferencialmente por diferentes técnicos, lotes de meios de cultura, estufas de incubação, etc., com o objectivo de estimar a incerteza.

A abordagem ao cálculo de incerteza na determinação pelo número mais provável não está no âmbito deste guia.

3 Referências Bibliográficas

As seguintes normas ou documentos normativos são referenciados ou relevantes no âmbito deste guia:

- ISO/TS 19036 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - guide on estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.
- ISO/TS 21748 - Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation, 2004.
- Uncertainty of measurement precision and limits of detection in chemical and microbiological testing laboratories - International Accreditation New Zealand, October 2003.
- Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), BIPM/IEC/IFCC/ISO/IUPAC/IUPAP/OIML, 1995.
- EA 4/16 - EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing. European co-operation for Accreditation; 2003
- QSOP4 - Uncertainty of Measurement in Testing; Standards Unit, Evaluations & Standards Laboratory; 2005

4 Definições

Incerteza (da medição) - parâmetro, associado ao resultado da medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos à mensuranda (GUM).

Incerteza expandida, U - quantidade que define um intervalo de um resultado de uma medição no qual é esperado que inclua uma grande fracção da distribuição dos valores que podem razoavelmente ser atribuídos à mensuranda (GUM).

Factor de expansão, k - factor numérico usado como um multiplicador da incerteza combinada de modo a obter a incerteza expandida (GUM).

A incerteza expandida (U) deverá ser calculada através da seguinte fórmula:

$$U = k \cdot \sqrt{S_R^2}$$

$k \cong 2$ (a um nível de confiança de 95%), de acordo com a tabela da distribuição de t de Student.

5 Classificação de matrizes

As matrizes podem ser agrupadas com base nas suas propriedades físicas em quatro grupos distintos, tais como:

- Líquidos e pós (p. ex. água, leite, leite em pó, leite de soja, leite de coco);
- Sólidos bem misturados (p. ex. carne picada, carne separada mecanicamente, carne de salsicha, carne esmagada, gelado de leite, natas batidas, creme de soja);
- Sólidos pequenos (ou muito pequenos) (p. ex. salsa desidratada/cogumelos, cenouras raladas, salada, camarões, cereais, alimentos para animais, avelãs trituradas, etc.);
- Outros sólidos (p. ex. queijo, carne não picada, pastelaria, etc.).

6 Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade

Podem ser seleccionadas três possibilidades diferentes para a estimativa do desvio padrão da reprodutibilidade (s_R), com a seguinte ordem de prioridades:

- 1ª opção: desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial ou precisão intermédia;
- 2ª opção: desvio padrão da reprodutibilidade do método proveniente de um estudo interlaboratorial;
- 3ª opção: desvio padrão da reprodutibilidade proveniente de um ensaio interlaboratorial de avaliação de desempenho.

Antes de se proceder aos cálculos e após transformação logarítmica dos dados devem ser excluídos os valores aberrantes.

6.1 Desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial

Para um microrganismo/método ou grupo de microrganismos e para uma dada matriz o protocolo deverá ser efectuado para pelo menos 10 amostras em duplicado da mesma matriz ou grupo de matrizes. O protocolo deve ser repetido de preferência para diferentes amostras da mesma matriz em dias diferentes permitindo assim cobrir as variações das condições operativas. Estimar anualmente o valor da incerteza com os dados recolhidos ao longo do ano para uma maior representatividade.

O desvio padrão da reprodutibilidade deve ser calculado com os dados do controlo de qualidade interno ou seja com os resultados dos ensaios efectuados em duplicado, em condições de precisão intermédia, cujo número de unidades formadoras de colónias (ufc) seja superior a 10.

O cálculo do desvio padrão dos dados transformados em logaritmo facilita a estabilização da variância da reprodutibilidade nos diferentes níveis de contaminação, desde que valores baixos de contagens não sejam considerados (menos de 10 colónias, para alimentos e águas). Deve-se no entanto ter em consideração que a toma das amostras e/ou suas diluições devem ser escolhidas de modo a cobrir a gama de concentrações encontradas em rotina.

Sempre que possível, devem ser usadas amostras naturais contaminadas.

Para permitir calcular a média dos duplicados para cada amostra i de n amostras de uma determinada matriz, os valores em ufc devem ser convertidos para logaritmos de base 10.

Calcular a variância da reprodutibilidade para cada amostra i :

$$S_{Ri}^2 = \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}$$

sendo:

i - o índice da amostra, $i=1$ de n ($n \geq 10$).

A e B - são os índices das condições de reprodutibilidade

y - são os resultados transformados em \log_{10} (ufc/g) ou \log_{10} (ufc/mL).

Obtém-se então o desvio padrão da reprodutibilidade S_R para as n amostras de uma dada matriz do modo seguinte:

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n S_{Ri}^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}{2n}}$$

O resultado S_R obtido na fórmula anterior é então usado para a obtenção da incerteza expandida:

$$U = k \cdot \sqrt{S_R^2}$$

Tabela 1 Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade - exemplo de contagem de flora mesófila num alimento sólido (ISO/TS 19036).

i	x_{iA}	x_{iB}	$y_{iA} = \log_{10}(x_{iA})$	$y_{iB} = \log_{10}(x_{iB})$	$S_{Ri}^2 = \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}$
$i=1$	$6,7 \times 10^4$	$8,7 \times 10^4$	4,83	4,94	0,0064
$i=2$	$7,1 \times 10^6$	$6,2 \times 10^6$	6,85	6,79	0,0017
$i=3$	$3,5 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	5,54	5,64	0,0049
$i=4$	$1,0 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	7,00	6,63	0,0672
$i=5$	$1,9 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	7,28	7,23	0,0012
$i=6$	$2,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	5,36	5,18	0,0172
$i=7$	$5,3 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	8,72	8,61	0,0062
$i=8$	$1,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	4,00	4,08	0,0031
$i=9$	$3,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	4,48	4,11	0,0659
$i=10$	$1,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	8,04	8,34	0,0453

Usando os dados em logaritmo, sem arredondamento, o desvio padrão da reprodutibilidade é:

$$S_R = 0,15 \log_{10} (\text{ufc/g})$$

Tabela 2 Cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade - exemplo de enumeração de Enterococos em água.

i	x_{iA}	x_{iB}	$y_{iA} = \log(x_{iA})$	$y_{iB} = \log_{10}(x_{iB})$	$S_{Ri}^2 = \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}$
$i = 1$	27	26	1,43	1,41	0,0001
$i = 2$	39	55	1,59	1,74	0,0111
$i = 3$	40	36	1,60	1,56	0,0010
$i = 4$	10	16	1,00	1,20	0,0208
$i = 5$	18	32	1,26	1,51	0,0312
$i = 6$	38	41	1,58	1,61	0,0005
$i = 7$	36	22	1,56	1,34	0,0229
$i = 8$	42	49	1,62	1,69	0,0022
$i = 9$	11	10	1,04	1,00	0,0009
$i = 10$	25	26	1,40	1,41	0,0001
$i = 11$	10	12	1,00	1,08	0,0031
$i = 12$	15	17	1,18	1,23	0,0015
$i = 13$	22	28	1,34	1,45	0,0055
$i = 14$	12	16	1,08	1,20	0,0078
$i = 15$	28	20	1,45	1,30	0,0107
$i = 16$	35	30	1,54	1,48	0,0022
$i = 17$	30	30	1,48	1,48	0,0000
$i = 18$	18	21	1,26	1,32	0,0022
$i = 19$	14	18	1,15	1,26	0,0060
$i = 20$	35	40	1,54	1,60	0,0017
$i = 21$	29	17	1,46	1,23	0,0269
$i = 22$	33	24	1,52	1,38	0,0096
$i = 23$	10	13	1,00	1,11	0,0065
$i = 24$	53	57	1,72	1,76	0,0005
$i = 25$	18	15	1,26	1,18	0,0031

$$S_R = \sqrt{\frac{0,0001 + 0,0111 + \dots + 0,0031}{25}} = 0,085 \log_{10} (\text{ufc/mL})$$

6.2 Desvio padrão da reprodutibilidade do método proveniente de um estudo interlaboratorial

Se o método usado em rotina pelo laboratório foi submetido a um estudo interlaboratorial para validação do mesmo, o laboratório poderá usar o desvio padrão da reprodutibilidade do método para estimar a medida da sua incerteza sob certas condições:

As condições são:

- o estudo interlaboratorial de validação do método contemplou correctamente todas as fontes de incerteza (especialmente preparação da amostra e homogeneização);
- a repetibilidade e a reprodutibilidade intralaboratoriais são inferiores ou iguais à repetibilidade e à reprodutibilidade provenientes do estudo interlaboratorial de validação do método, caso contrário recorrer a um teste estatístico adequado, por exemplo teste de F (ver ISO/TS 21748, nos pontos 13 e 14).

$$U = k \cdot \sqrt{S_R^2}$$

6.3 Desvio padrão da reprodutibilidade do método proveniente de um estudo interlaboratorial de avaliação de desempenho

Se o laboratório participou num ensaio interlaboratorial de avaliação de desempenho pode ser usado o desvio padrão da reprodutibilidade desse ensaio para deduzir a medida da sua incerteza, sob as seguintes condições:

- durante o ensaio interlaboratorial de avaliação de desempenho o método utilizado é o da rotina do laboratório;
- as amostras usadas no ensaio são comparáveis às analisadas no laboratório em rotina;
- um número suficiente de laboratórios participantes nos ensaios usa o mesmo método.

7 Expressão da medida da incerteza

A incerteza pode ser expressa como um intervalo de \log_{10} , em valores naturais (número de ufc). Não devem ser usados mais do que dois algarismos significativos para reportar os resultados ou o intervalo da incerteza.

O resultado da análise pode ser expresso de acordo com uma das possibilidades:

- $y \pm 2s_R (\log_{10})$;
- $y \log_{10} [y - 2s_R, y + 2s_R]$;
- $x \text{ ufc/g ou ufc/ml } [10^{y-2s_R}, 10^{y+2s_R}]$

Exemplo: um desvio padrão de reprodutibilidade de $s_R \pm 0,15 \log_{10}$ foi encontrado no exemplo da Tabela 1. Assim a incerteza expandida U, com um factor de 2 (limite de confiança de 95%) é $0,15 \times 2 = \pm 0,3 \log_{10}$. O resultado do ensaio é $5,0 \log_{10}$ (ufc/g).

Assim o resultado pode ser reportado de uma das maneiras seguintes:

- $5,0 \log_{10} \pm 0,3 \log_{10}$;
- $5,0 \log_{10} [4,7, 5,3]$;
- $10^5 \text{ ufc/g } [5,0 \times 10^4, 2,0 \times 10^5]$;

No caso do exemplo da Tabela 2 foi encontrado um desvio padrão de reprodutibilidade de $s_R \pm 0,085 \log_{10}$.

A incerteza expandida U, com um factor de 2 (limite de confiança de 95%) é $0,085 \times 2 = \pm 0,17 \log_{10}$.

Assim para um resultado de um ensaio de 30 ufc/100mL transforma-se o valor de 30 em $\log_{10} = 1,48 \log_{10}$

- $1,48 \log_{10} \pm 0,17 \log_{10}$
- $1,48 \log_{10} [1,65; 1,31]$
- $30 \text{ ufc /100mL } [20; 44]$

O número de algarismos significativos da incerteza deve ser arredondado a 1 (ou no máximo 2) dígitos, e as casas decimais da incerteza e do resultado arredondadas em consonância.