



Coordenação Geral de Acreditação

**ORIENTAÇÃO SOBRE AVALIAÇÃO DE
DESEMPENHO DE MÉTODOS ANALÍTICOS -
MICROBIOLOGIA**

Documento de caráter orientativo

DOQ-CGCRE-089

Revisão 00 – DEZ/2017

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de Aplicação
3. Responsabilidade
4. Histórico das revisões
5. Documentos Complementares
6. Siglas
7. Definições
8. Introdução
9. Avaliação de métodos normalizados
 - 9.1. Ensaios Qualitativos - Procedimentos
 - 9.2. Ensaios Quantitativos – Procedimentos
 - 9.3. Considerações Finais
10. Documentos de Referência
11. Agradecimentos

1. OBJETIVO

Este documento tem como objetivo auxiliar os laboratórios a demonstrarem que um método microbiológico normalizado, desde que seguindo as orientações nas condições em que é utilizado (aplicado), apresenta as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida.

Este documento foi desenvolvido de acordo com as diretrizes internacionais e contém aplicações sobre os requisitos da acreditação. Caso o laboratório siga essas orientações, atende aos respectivos requisitos; caso contrário, o laboratório deve demonstrar como é assegurado o seu atendimento. As não conformidades constatadas numa avaliação são registradas contra o requisito da acreditação e não contra este documento orientativo, porém as orientações deste documento serão consideradas pelos avaliadores e especialistas.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se à Dicla, aos laboratórios de ensaios microbiológicos acreditados ou postulantes à acreditação, e aos avaliadores e especialistas atuantes em processos de acreditação desses laboratórios.

3. RESPONSABILIDADE

A responsabilidade pela revisão deste documento é da Dicla.

4. HISTÓRICO DAS REVISÕES

Documento inicial.

5. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

Aplicam-se as últimas edições dos seguintes documentos:

ABNT NBR ISO/IEC 17000	Avaliação de conformidade – Vocabulário e princípios gerais.
DOQ-Cgcre-008	Orientação sobre validação de métodos analíticos
DOQ-Cgcre-020	Definições de termos utilizados nos documentos relacionados à acreditação de laboratórios, produtores de materiais de referência e provedores de ensaios de proficiência.

DOQ-Cgcre-049	Orientação para a elaboração dos escopos de acreditação voltados aos laboratórios de ensaios que atuam nas áreas de atividade: alimentos e bebidas e meio ambiente, focando ensaios biológicos.
DOQ-Cgcre-051	Orientação para a elaboração dos escopos de acreditação voltados aos laboratórios de ensaios na área de atividade: produtos químicos, subárea: produtos farmacêuticos.
ISO 17034	General requirements for the competence of reference material producers
ISO 5725-1:1994	Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results-- Part 1: General principles and definitions
ISO 5725-3	Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results-- Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method
ISO Guide 34	General requirements for the competence of reference material producers
ISO/IEC 17025	General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
NIT-Dicla-016	Elaboração de escopo de laboratórios de ensaios e de provedores de ensaios de proficiência.
NIT-Dicla-026	Requisitos sobre a participação dos laboratórios de ensaio e calibração em atividades de ensaio de proficiência.
Nit-Dicla-030	Rastreabilidade Metrológica na Acreditação de Organismos de Avaliação da Conformidade e no Reconhecimento da Conformidade aos Princípios das BPL
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia - Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. 1ª Edição Luso Brasileira, Rio de Janeiro.

6. SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APHA	American Public Health Association
Cgcre	Coordenação Geral de Acreditação
Dicla	Divisão de Acreditação de Laboratórios
DOQ	Documento Orientativo
IEC	International Electrotechnical Commission
ISO	International Organization for Standardization
NBR	Norma Brasileira
SMEWW	Standard Methods for the Examination Water and Wastewater
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

7. DEFINIÇÕES

Para o propósito deste documento, são adotadas as definições contidas nos documentos complementares.

Amostra – porção ou embalagem(ns) individual(is) tomadas para ensaio, de forma aleatória de uma partida do produto. (RDC 12:2001).

Amostra artificialmente contaminada - é uma porção adicional de uma amostra na qual, antes do seu processamento, são adicionadas quantidades conhecidas dos micro-organismos de interesse.

Amostra naturalmente contaminada – amostra com microbiota própria.

Categorias de alimentos – referem-se às categorias de alimentos recomendados. Relação de grupos de alimentos e crescimento dos principais patógenos. (ISO 16140:2003).

Cultura de referência – cepas de micro-organismos de referência. Culturas de referência rastreáveis são necessárias para estabelecer um desempenho aceitável de meios de cultura (incluindo kits de teste), para a validação de métodos e de verificação/confirmação de desempenho em uso para demonstrar a validade dos resultados de medição, os laboratórios devem usar cepas de referência de micro-organismos obtidos diretamente de uma coleção de culturas reconhecida nacional ou internacional. Onde não há culturas de referência prontamente disponíveis, derivados rastreáveis podem ser utilizados alternativamente, desde que a propriedade pertinente para o seu uso pretendido seja demonstrada pelo laboratório para ser equivalente no seu uso. (Eurachem/2013, SANAS TG 28-02:2008).

Cultura de referência certificada – cepa de micro-organismo de referência acompanhada de uma documentação emitida por uma entidade reconhecida (Coleção de Culturas acreditada segundo ISO Guide 34 ou, caso dependendo da política de transição, ISO 17034), a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas (quando se trata de cepa quantificada), e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos. A documentação mencionada é emitida sob a forma de um certificado. (Eurachem/2013). Ver também critérios estabelecidos na Nit-Dicla-030.

Especificidade - é a probabilidade de uma amostra negativa pelo método de referência ser corretamente detectada como negativa pelo método teste.

Incerteza de medição - Parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas. O parâmetro pode ser, por exemplo, um desvio padrão.

Matriz – refere-se às categorias de: alimentos, bebidas, produtos químicos, água ou material de superfície de ambiente a ser incluído na avaliação de acordo com a utilização pretendida do método. (AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. 2012).

Método normalizado – método desenvolvido por um organismo de normalização ou outras organizações cujos métodos são aceitos pelo setor técnico em questão. (DOQ-Cgcre-020).

Método qualitativo - método de ensaio para o qual a resposta é a presença ou a ausência do micro-organismo, detectado direta ou indiretamente numa certa quantidade de amostra. (ISO 16140:2003).

Método quantitativo - método de ensaio para o qual a resposta é uma determinada quantidade de micro-organismo, medida diretamente (ou seja, enumeração em uma massa ou volume), ou indiretamente (cor, absorvância, impedância, etc) numa certa quantidade de amostra. (ISO 16140:2003).

Precisão - grau de concordância entre resultados de testes independentes obtidos em condições estipuladas.

Notas:

A precisão depende da distribuição dos erros aleatórios e não se relaciona com o valor real ou o valor especificado.

O valor da precisão é geralmente expresso em termos de imprecisão e computado como desvio padrão dos resultados dos testes. Menor precisão é refletida por um desvio superior.

Resultados de testes independentes significam que os resultados são obtidos de forma a não serem influenciados por qualquer resultado anterior no mesmo ou similar objeto de teste. As medidas quantitativas de precisão dependem criticamente das condições estipuladas. Condições de repetibilidade e reprodutibilidade são exemplos particulares de extremas condições estipuladas. (ISO/TS 21748:2004, ISO 5725-1:1994 Part 1).

Precisão intermediária - A precisão intermediária, de acordo com a ISO 5725-3, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos. (DOQ-Cgcre-008).

Repetibilidade - precisão sob condições de repetibilidade, isto é, condições em que resultados de testes independentes são obtidos com o mesmo método e itens de testes idênticos, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, em curtos intervalos de tempo. (ISO/TS 21748:2004).

Reprodutibilidade – precisão em condições de reprodutibilidade, ou seja, condição em que os resultados do teste são obtidos com o mesmo método e itens de teste idênticos em diferentes laboratórios com os diferentes operadores utilizando equipamentos diferentes. (ISO/TS 21748:2004).

Sensibilidade - é a habilidade do método de detectar variações leves na contagem do micro-organismo em uma dada matriz. (ISO 16140:2003).

Taxa de falso negativo - a fração de resultados negativos observados incorretamente. (ISO 16140:2003).

Taxa de falso positivo - a fração dos resultados positivos observados incorretamente. (ISO 16140:2003).

Verificação – um laboratório usando métodos normalizados (padrão) tem de confirmar que ele tem a capacidade para realizar a verificação do método, isto é, confirmar os dados obtidos na verificação com os dados do desempenho do método normalizado. Demonstrar que pode repetir no laboratório o desempenho do método normalizado. (NATA –Technical Note 17 — October 2013, SANAS. TG 28-2: 2008).

8. INTRODUÇÃO

A avaliação de desempenho, também conhecida como verificação / confirmação de desempenho de um método normalizado, é um processo experimental documentado desenvolvido pelo laboratório com o objetivo de comprovar que o método avaliado/verificado opera adequadamente dentro das condições do laboratório, comparando-o com as especificações deste método, estabelecidas durante a validação.

A utilização de métodos de ensaios normalizados para enumeração e detecção de micro-organismos em matrizes de alimentos, meio ambiente, produtos químicos (cosméticos, saneantes, medicamentos e fármacos) é uma das ferramentas para determinar a qualidade microbiológica dos produtos. No entanto, a confiabilidade dos resultados analíticos é assegurada através da avaliação do desempenho da metodologia utilizada, entre outros procedimentos implantados para a garantia da qualidade.

Antes de implementar os ensaios, o laboratório deve demonstrar e confirmar que tem condições de operar adequadamente um método normalizado e fornecer evidência objetiva de que os requisitos específicos para um uso pretendido são atendidos (ISO/IEC 17025 7.2).

O método de ensaio normalizado deve ser avaliado quanto ao seu desempenho no laboratório para as categorias de produtos definidas no escopo, utilizando ou não métodos de referência correspondentes, em paralelo.

Antes de iniciar o processo, o laboratório deve confirmar se as características de desempenho dos equipamentos atendem ao exigido pelo método em estudo, se os insumos e culturas de referência certificadas são adequados ao uso e, somente o pessoal devidamente treinado e capacitado no ensaio em questão deve realizar o processo de avaliação.

Para o desenvolvimento do processo de avaliação de desempenho do método, o laboratório deve planejar a execução do trabalho, definindo de forma clara e objetiva a sua aplicação. Os parâmetros que serão avaliados e os critérios de aceitação para o desempenho do método devem ser definidos previamente e, quando esses parâmetros já constarem da sua publicação, estes devem ser considerados pelo laboratório para a análise crítica e confirmação da adequação do método ao uso pretendido na realidade operacional do laboratório.

Os experimentos realizados devem ser documentados e os resultados registrados de forma a garantir a rastreabilidade de todo o processo.

Quando o laboratório usa um kit de teste comercial em que a metodologia e os reagentes são inalterados a partir de instruções do fabricante, a avaliação de desempenho deve ser realizada antes da implementação do mesmo.

Pequenos desvios para o método normalizado como, por exemplo, uso de meio de cultura diferente para o crescimento do micro-organismo, diferentes meios seletivos para isolamento, diluições (como consequência para contagens esperadas), alteração na temperatura de incubação devem ser avaliados para demonstrar que não há alterações no resultado esperado.

9. AVALIAÇÃO DE MÉTODOS NORMALIZADOS

Os métodos normalizados são divididos em métodos qualitativos e métodos quantitativos.

Para os métodos qualitativos, os parâmetros avaliados são especificidade, sensibilidade, precisão, taxa de falso-positivo e taxa de falso-negativo. Já para os métodos quantitativos, são avaliados os parâmetros de repetibilidade e reprodutibilidade. (Technical Note 17: October 2013).

Para as amostras contaminadas artificialmente, realizar a contaminação da amostra com cultura de referência certificada, tanto para o micro-organismo alvo como para os interferentes. Neste caso, realizar paralelamente a contagem do micro-organismo em questão para garantir a concentração inoculada.

Avaliar as culturas de referência certificadas, criticamente, conforme o requisito 6.6 da norma ISO/IEC 17025.

Para a realização da avaliação de desempenho do método, é importante lembrar que todas as etapas do procedimento, como amostra branco, duplicatas, culturas de referência certificadas, diluição, entre outros, devem estar bem definidos, monitorados e controlados.

Para a garantia do controle de qualidade da rotina analítica, não é necessário o acompanhamento com uma cultura de referência certificada, podendo a mesma ser somente uma cultura de referência.

Seleção de amostras – Selecionar amostras representativas, de acordo com o escopo do laboratório. Consultar NIT-Dicla-016 - Elaboração de escopo de laboratórios de ensaios e de provedores de ensaios de proficiência, DOQ-Cgcre-049 - Orientação para a elaboração dos escopos de acreditação voltados aos laboratórios de ensaios que atuam nas áreas de atividade: alimentos e bebidas e meio ambiente, focando ensaios biológicos e DOQ-Cgcre-051 - Orientação

para a elaboração dos escopos de acreditação voltados aos laboratórios de ensaios na área de atividade: produtos químicos, subárea: produtos farmacêuticos.

A seleção de amostras deve ser abrangente, demonstrando aplicabilidade do método avaliado para diferentes tipos de produtos.

9.1 Ensaios qualitativos - Procedimentos

Preparação de amostra

Para avaliação de métodos qualitativos, utilizar amostras artificialmente contaminadas com cultura de referência certificada, partindo de amostras conhecidamente negativas para o micro-organismo alvo.

De acordo com a HEALTH PRODUCTS AND FOOD BRANCH (2011), recomenda-se que, para o processo de avaliação de desempenho do método, sejam avaliadas, no mínimo, 10 amostras que sejam mais importantes dentre as categorias definidas no escopo do laboratório.

Partindo de uma mesma amostra, preparar separadamente 2 porções iguais, de acordo com a metodologia escolhida, onde uma delas deve ser analisada diretamente (controle negativo) e a outra contaminada artificialmente com o micro-organismo alvo e, ao menos, um interferente. Para o micro-organismo alvo, a concentração deve estar próxima ao limite de detecção do método, como, por exemplo, de 1 a 5 UFC/ 25 g ou 1 a 5 UFC/100 mL.

Para os micro-organismos interferentes, a concentração deve estar dois níveis de \log_{10} acima do nível de concentração do micro-organismo alvo. (Technical Note 17: October 2013 e SANAS. TG 28-2: 2008).

De preferência, selecionar amostras sabidamente negativas para a presença do micro-organismo alvo, em questão.

Paralelamente, utilizar um meio de cultura não inoculado como garantia dos resultados obtidos (branco).

Contaminação da amostra

Exemplo:

Cultura de Referência Certificada – cultivada por 24h → diluição decimal seriada.

Contagem – fase estacionária = $2,0 \times 10^8$ UFC/mL.

Diluição	UFC/mL
10^{-8}	2
10^{-7}	20
10^{-6}	200
10^{-5}	2.000
10^{-4}	20.000
10^{-3}	200.000
10^{-2}	2.000.000
10^{-1}	20.000.000
10^{-0}	200.000.000

2 UFC em 25g = adicionar 1mL da diluição 10^{-8}

Avaliação de desempenho do método

Após a conclusão dos testes, os resultados são agrupados nos itens abaixo, os quais permitem calcular os seguintes critérios de desempenho (SAC-SINGLAS - Guidance Notes C&B and ENV 002 – Method validation of microbiological methods. 2002).

- a= número de presumíveis positivos encontrados como positivo (verdadeiros positivos)
- b= número de presumíveis negativos encontrados como positivo (falsos negativos)
- c= número de presumíveis positivos encontrados como negativos (falsos positivos)
- d= número de presumíveis negativos encontrados como negativos (verdadeiros negativos)

Resultado confirmado	Resultado presuntivo obtido			Cálculos (%)				
	Positivo	Negativo	Resultado	Sensibilidade	Especificidade	Precisão	Taxa de falso positivo	Taxa de falso negativo
Positivo	a	b	a + b	$a/(a+b) \times 100$	$d/(c+d) \times 100$	$(a+d)/n \times 100$	$c/(a+c) \times 100$	$b/(b+d) \times 100$
Negativo	c	d	c + d					
Resultado	a + c	b + d	n					

$$(\%) \text{ Sensibilidade} = \frac{\text{Verdadeiro Positivo}}{\text{Falso Negativo} + \text{Verdadeiro Positivo}} \times 100$$

$$(\%) \text{ Especificidade} = \frac{\text{Verdadeiro Negativo}}{\text{Falso Positivo} + \text{Verdadeiro Negativo}} \times 100$$

$$(\%) \text{ Precisão} = \frac{\text{Verdadeiro Positivo} + \text{Verdadeiro Negativo}}{\text{Total}} \times 100$$

$$(\%) \text{ Taxa de Falsos Positivos} = \frac{\text{Falso Positivo}}{\text{Falso positivo} + \text{Verdadeiro positivo}} \times 100$$

$$(\%) \text{ Taxa de Falsos Negativos} = \frac{\text{Falso Negativo}}{\text{Falso negativo} + \text{Verdadeiro negativo}} \times 100$$

Cabe ao laboratório fazer a análise crítica dos resultados, de acordo com as suas necessidades, e definir seu critério de aceitação.

Como referência, a HEALTH PRODUCTS AND FOOD BRANCH (2011) recomenda que as especificações ou critérios de desempenho para métodos qualitativos devem atingir ou superar os seguintes valores.

1. Sensibilidade > 98%
2. Especificidade > 90,4%
3. Taxas de Falsos negativo < 2,0%
4. Taxas de Falsos positivos < 9,6%
5. Precisão > 94%

Exemplo – SAC-SINGLAS - Guidance Notes C&B and ENV 002 – Method validation of microbiological methods. 2002.

Resultado confirmado	Resultado presuntivo obtido			Resultado (%)				
	Positivo	Negativo	Resultado	Sensibilidade	Especificidade	Precisão	Taxa de falso positivo	Taxa de falso negativo
Positivo	a=250	b= 8	258	97	86	92	7	6
Negativo	c=20	d=120	140					
Total	270	128	398					

9.2 Ensaios quantitativos - Procedimentos

Para avaliação dos métodos quantitativos, devem ser utilizadas, de preferência, amostras naturalmente contaminadas com o micro-organismo alvo e, em situações nas quais estas amostras não estiverem disponíveis, devem ser utilizadas amostras artificialmente contaminadas.

Para as amostras contaminadas artificialmente, realizar a contaminação da amostra com cultura de referência certificada tanto para o micro-organismo alvo como para os interferentes. Neste caso, realizar paralelamente a contagem do micro-organismo em questão para garantir a concentração inoculada.

Preparação de amostra

De acordo com a HEALTH PRODUCTS AND FOOD BRANCH (2011), recomenda-se que, para o processo de avaliação de desempenho do método, sejam avaliadas, no mínimo, 10 amostras que sejam mais importantes dentre as categorias definidas no escopo do laboratório.

Preparar a amostra, de acordo com a metodologia escolhida, sendo que a concentração escolhida deve ser inoculada em duplicata.

A recomendação de uso de 10 amostras, em duplicata, é baseada na especificação para a estimativa de incerteza de medição e é aplicável a métodos quantitativos. (ISO 19036:2006, SMEWW-Part 9000. 22nd edition. 2012).

Os resultados das 10 amostras fornecem informações suficientes sobre a variabilidade de um método quantitativo e permite uma decisão sobre o desempenho do método e sua adequação ao fim.

Caso não haja amostras naturalmente contaminadas, preparar uma concentração de micro-organismo alvo de forma a obter uma contagem na placa dentro da faixa ideal de contagem do método de acordo com a matriz.

O mesmo procedimento deve ser repetido, em diferentes dias, variando ao menos 2 critérios, como exemplo analista, equipamento, lote de meio de cultura ou outro parâmetro que seja relevante para o ensaio.

Paralelamente, utilizar um meio de cultura não inoculado como garantia dos resultados obtidos (branco).

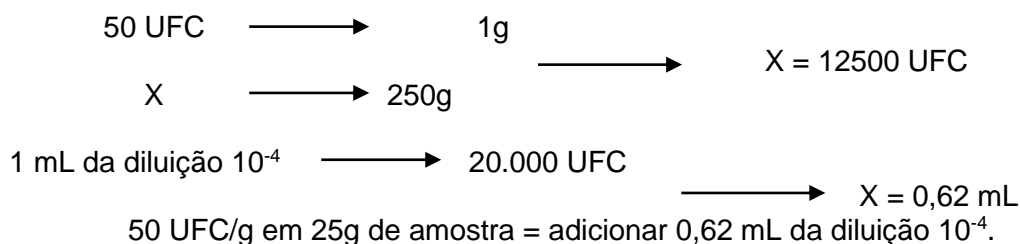
Contaminação da amostra

Exemplo:

Cultura de Referência Certificada – cultivada por 24h → diluição decimal seriada.

Contagem – fase estacionária = $2,0 \times 10^8$ UFC/mL.

Diluição	UFC/mL
10^{-8}	2
10^{-7}	20
10^{-6}	200
10^{-5}	2.000
10^{-4}	20.000
10^{-3}	200.000
10^{-2}	2.000.000
10^{-1}	20.000.000
10^0	200.000.000



Avaliação de desempenho do método

Após a conclusão dos testes, calcular:

Repetibilidade –

Para calcular a repetibilidade, utilizar os valores de 10 contagens realizadas em duplicata, pelo mesmo analista, utilizando o mesmo procedimento, nas mesmas condições em curto período de tempo.

Exemplo – Cálculo do desvio padrão da repetibilidade na Contagem Padrão de Bactérias em água (SAC-SINGLAS - Guidance Notes C&B and ENV 002 – Method validation of microbiological methods. 2002)

Teste nº	Contagem placa 1 (a)	Contagem placa 2 (b)	log a	log b	Média dos log	log a - log b	Diferença / Média	Quadrado da Diferença / Média
1	93	86	1.9685	1.9345	1.9515	0.0340	0.0174	0.000303
2	34	30	1.5315	1.4771	1.5043	0.0544	0.0361	0.001306
3	98	73	1.9912	1.8633	1.9273	0.1279	0.0664	0.004404
4	89	83	1.9494	1.9191	1.9342	0.0303	0.0157	0.000246
5	116	104	2.0645	2.0170	2.0407	0.0474	0.0232	0.000540
6	168	156	2.2253	2.1931	2.2092	0.0322	0.0146	0.000212
7	62	56	1.7924	1.7482	1.7703	0.0442	0.0250	0.000623
8	38	28	1.5798	1.4472	1.5135	0.1326	0.0876	0.007679
9	330	300	2.5185	2.4771	2.4978	0.0414	0.0166	0.000275
10	2300	2040	3.3617	3.3096	3.3357	0.0521	0.0156	0.000244

$$\text{Desvio Padrão da Repetibilidade} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} \left[\frac{(\log a_i - \log b_i)}{X_i} \right]^2}{2p}}$$

$$= \sqrt{\frac{0.000303 + 0.001306 + \dots + 0.000244}{2 \times 10}} = \sqrt{\frac{0.015832}{20}} = 0.0281$$

Coeficiente de variação (CV%) 100 x Desvio Padrão Relativo = 2,81%

Reprodutibilidade

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

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

Onde:

S_{Ri}^2 = Variância da reprodutibilidade da amostra i .

i = Índice de cada amostra, $i = 1$ até n ($n \geq 10$).

A e B = Duplicatas de cada amostra i (reprodutibilidade).

y = Resultados transformados em \log_{10} (UFC/g) ou \log_{10} (UFC/mL).

- Calcular o desvio padrão da reprodutibilidade S_R

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

Onde:

S_R = Desvio padrão da reprodutibilidade (\log_{10})

n = Número de amostras analisadas para estimativa da incerteza ($n \geq 10$).

i = Índice de cada amostra, $i = 1$ até n .

A e B = Duplicatas de cada amostra i (reprodutibilidade).

y = Resultados transformados em \log_{10} (UFC/g) ou \log_{10} (UFC/mL).

S_{Ri} = Variância da reprodutibilidade da amostra i .

Quando os critérios de aceitação estiverem disponíveis para repetibilidade e reprodutibilidade, recomenda-se que o laboratório avalie se os seus resultados são iguais ou melhores, garantindo o desempenho do método avaliado, no seu laboratório.

Caso não estejam disponíveis, cabe ao laboratório avaliar e determinar a aceitabilidade ou não dos mesmos, após análise dos valores encontrados.

9.3 Considerações Finais

A documentação para avaliação de desempenho de métodos normalizados deve:

- Ter a descrição do procedimento de avaliação do método normalizado, detalhando as características analíticas do desempenho que devem ser avaliadas e os critérios de aceitação, utilizados para determinar a execução do procedimento adequadamente.
- Deve documentar, em forma de um relatório, todas as etapas, resultados, critérios e justificativas, que garantam a rastreabilidade da avaliação e comprovem o desempenho do método a ser implementado.
- A participação em um programa de ensaios de proficiência é uma evidência adicional e independente do desempenho do método em questão. O laboratório postulante à acreditação deve atender à política da CGCRE conforme estabelecido na Norma NIT-Dicla-026 - Requisitos sobre a participação dos laboratórios de ensaio e calibração em atividades de ensaio de proficiência. Os resultados de repetibilidade e reprodutibilidade podem ser utilizados pelo laboratório para o cálculo da estimativa de incerteza de medição para o método avaliado.

10. DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

AFNOR VALIDATION - NF148	General validation protocol – Revision 2 -17 May 2013.
AOAC	International Methods Committee Guidelines for Validation of quantitative and qualitative food microbiological official methods of analysis. Vol. 85, Nº 5, 2002.
AOAC	International Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. 2012.
AOAC	Technical Division for Laboratory Management (TDLM,). How to Meet ISO 17025. Requirements for Method Verification. Analytical Laboratory Accreditation Criteria Committee (ALACC). 2007.
APHA.	Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition. 2012.
DOQ-CGCRE-053	Exemplos de estimativa de incerteza de medição em ensaios microbiológicos.
Eurachem	Accreditation for microbiological laboratories. 2nd edition, 2013.
FDA/ORA	Laboratory manual. Volume II - Methods, Method Verification and Validation ORA-LAB.5.4.5. 2003.
Health Products and Food Branch	– Ottawa – Procedure for the Development and Management of Food Microbiological Methods. Part 4: Guidelines for the Relative Validation of Indirect Qualitative Food Microbiological Methods. 2011.
ISO 11133-1:2009	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.
ISO 11133-2:2011	Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media. Part 2: General guidelines on performance testing of culture media. Amendment 1: Test microorganisms for commonly used culture media.
ISO 16140:2003	Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods.
ISO 16140:2011	Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods. Amendment 1.

- ISO/TS 19036:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.
- ISO/TS 19036:2009 Amd.1.
- ISO/TS 21748:2004 Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimation in measurement uncertainty estimation.
- NATA – Australia Technical Note 17 — October 2013. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods.
- Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.
- SAC-SINGLAS. Guidance Notes C&B and ENV 002. Method validation of microbiological methods. Singapore Accreditation Council. July 2002.
- SANAS – South African National Accreditation System. TG 28-02. Guidelines on validation and quality assurance in microbiological testing.2008.
- USA. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – 22nd ed. 2012.

11 AGRADECIMENTOS

Este documento foi elaborado com o apoio dos especialistas membros da Comissão Técnica e Ensaio Biológicos (CT-06).