



Cálculo da estimativa da incerteza de medição associada ao ensaio de contagem de bactérias heterotróficas em matriz água purificada através da técnica de detecção por fluorescência

Measurement uncertainty calculation associated with heterotrophic bacterial count in purified water matrix using the fluorescence detection technique

RIALA6/1784

Ellen Gameiro HILINSKI¹, Fernando Pontes de Lima e SILVA¹, Fernanda Fernandes FARIAS¹, Edilene Afonso VIEIRA¹, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR¹, Terezinha de Jesus Andreoli PINTO², Adriana BUGNO¹

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, Av Dr. Arnaldo nº 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2963. E-mail: ellen.hilinski@ial.sp.gov.br

²Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 26.11.2019 - Aceito para publicação: 22.04.2020

RESUMO

A incerteza de medição representa o nível de confiança no resultado. Para a estimativa da incerteza de medição foi empregado o cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial de 48 ensaios de contagem de bactérias heterotróficas pela técnica da membrana filtrante com detecção por fluorescência pelo uso de substrato fluorogênico em amostras de água purificada contaminadas artificialmente entre 10 e 100 UFC/mL. O valor obtido, $1,3 \times 10^{-3}$ (\log_{10}), indica que a técnica utilizada pode ser uma alternativa para a estimativa da incerteza de medição em ensaios microbiológicos quantitativos de contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água purificada.

Palavras-chave. incerteza, contagem de colônia microbiana, água purificada, detecção por fluorescência.

ABSTRACT

Measurement uncertainty represents the confidence level in the result. To estimate the expanded measurement uncertainty, the standard deviation of intra-laboratory reproducibility of 48 heterotrophic bacterial count assays by fluorescence detection by the use of fluorogenic substrate on artificially contaminated purified water samples between 10 and 100 CFU/mL was used. The value obtained, 1.3×10^{-3} (\log_{10}), indicates that the technique used can be an alternative to estimate measurement uncertainty in quantitative microbiological heterotrophic bacterial count assays in purified water samples using fluorogenic substrate.

Keywords. uncertainty, microbial colony count, purified water, fluorescence detection.

A incerteza de medição é definida como parâmetro associado com o resultado de uma medição que caracteriza a dispersão dos valores que poderia razoavelmente ser atribuída ao mensurando¹.

Em geral, o resultado das medições são somente aproximações ou estimativas dos valores do mensurando e, portanto são considerados completos quando acompanhados da declaração do valor da incerteza².

De acordo com a ISO/IEC 17025³, os laboratórios de ensaios devem identificar e avaliar as contribuições de suas análises para a incerteza de medição do método, sendo, portanto, um requisito obrigatório para os laboratórios acreditados pela Coordenação Geral de Acreditação, segundo os requisitos desta norma quando o laboratório realizar uma declaração de conformidade frente a uma especificação.

O documento de caráter orientativo da Coordenação Geral de Acreditação do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)² informa que para a expressão da incerteza de medição, na grande maioria dos casos, faz-se necessário identificar e estimar as fontes individuais da variabilidade que contribuem para a incerteza do processo de medição. Entretanto, este mesmo documento enfatiza que os ensaios microbiológicos geralmente se enquadram na categoria que dispensa o cálculo rigoroso, metrológico e estatisticamente válido da incerteza de medição. Para este grupo de ensaios, a estimativa da incerteza de medição deve ser, portanto, realizada por meio de uma abordagem global, baseada no cálculo do desvio padrão referente à reprodutibilidade.

Como um procedimento analítico microbiológico contempla distintas etapas, como diluições, inoculação da amostra em meios de cultura adequados, período de incubação para crescimento e contagem para confirmação do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), podemos afirmar que a variabilidade operacional resultará do efeito conjunto destas etapas. Desta maneira, a incerteza total do resultado relacionado aos ensaios de contagens microbianas, deve ser estimada após a obtenção do resultado final devido à variação característica inerente aos ensaios de contagens.

Desta forma, para a estimativa da incerteza de medição em ensaios microbiológicos, o processo é

baseado na variabilidade total do processo analítico, o que resulta na utilização de uma abordagem global, que inclui a precisão observável (componente aleatório) e a tendência (bias) (componente sistemático). Para estes casos, a estimativa da incerteza de medição é derivada do desvio padrão experimental da reprodutibilidade do resultado final do processo de medição².

O ensaio de contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água purificada por meio da técnica de filtração por membrana utilizando detecção por fluorescência é um método microbiológico rápido que possibilita a redução de aproximadamente 67% do tempo analítico comparado com métodos microbiológicos compendiais.

O objetivo do trabalho foi calcular e expressar incerteza associada a resultados de determinações quantitativas em matriz água purificada e fornecer subsídios que possam auxiliar os laboratórios prestadores de serviços públicos e privados responsáveis pelo controle de qualidade de distintas categorias de águas tratadas, a atender este requisito estabelecido na norma ISO/IEC 17025:2017.

Os ensaios foram realizados pelos analistas A e B, em dias distintos. Foram preparadas, de acordo com as recomendações dos respectivos fabricantes, suspensões microbianas individuais, em triplicata, para quatro microrganismos, descritos a seguir: *Escherichia coli* NCTC 12923 (Biomerieux, Austrália), *Staphylococcus aureus* NCTC 10788 (Biomerieux, Austrália), *Burkholderia cepacia* NCTC 10743 (Biomerieux, Austrália) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Microbiologics, Estados Unidos da América)^{4,5}. Foram realizadas diluições seriadas para cada suspensão microbiana obtida, utilizando solução de cloreto de sódio 0,9 % (p/v), de forma a obter quatro faixas de concentrações compreendidas entre 10 e 100 UFC/mL para cada um dos microrganismos utilizados no estudo.

A faixa de trabalho das suspensões microbianas empregadas na condução dos ensaios incluiu como valor inferior o limite de quantificação da metodologia (10 UFC/placa) e como valor superior a especificação regulatória estabelecida para a contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água purificada⁶ e água para hemodiálise⁷. Uma representação simplificada deste procedimento é demonstrada na **Figura** a seguir.

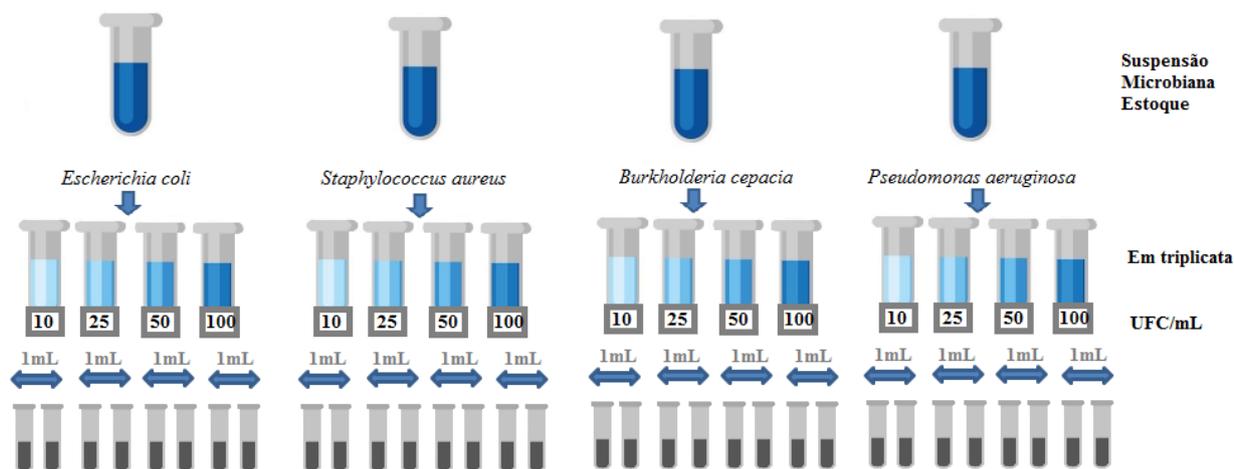


Figura. Representação simplificada da etapa experimental

Em sequência, 1 mL de cada inóculo microbiano foi transferido, em duplicata, de forma a contaminar artificialmente 100 mL de água purificada estéril. Com o auxílio do sistema Milliflex® Quantum (Millipore, Alemanha), foi realizada a filtração das amostras de água purificada, em membrana de ésteres mistos de celulose (HAWG) com tamanho de poro de 0,45 µm e diâmetro de 47 mm, contaminadas com os inóculos microbianos, compreendendo a faixa de concentração entre 10 e 100 UFC/mL⁸.

Após a filtração, a membrana foi assepticamente transferida para uma placa pré envasada com ágar R2A (Millipore, Alemanha), e o conjunto placa e membrana, então, incubado em estufa bacteriológica à temperatura de 24,0 ±

4,0°C pelo período de 40 horas. Após o período de incubação, a membrana foi assepticamente transferida para uma base de celulose umedecida com 2 mL do reagente de fluorescência (Millipore, Alemanha), e o conjunto incubado por 30 minutos na temperatura de 32,5 ± 2,5 °C para difusão do reagente. Após os 30 minutos de incubação, foi realizada a contagem das colônias fluorescentes utilizando o leitor Milliflex® Quantum.

A transformação logarítmica da média das contagens das colônias obtidas para cada um dos ensaios realizados pelos analistas A e B, seguido pelo cálculo da variância para cada par de ensaios realizado (analista A e B). Os valores de variância obtidos nos 48 pares de ensaios são apresentados na **Tabela** a seguir.

Tabela. Valores de variância obtidos nos 48 pares de ensaios de contagem de bactérias heterotróficas

Concentração teórica do inóculo/mL	Microrganismo			
	<i>S. aureus</i> NCTC 10788	<i>B. cepacia</i> NCTC 10743	<i>E. coli</i> NCTC 12923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027
10 UFC	0,00039	0,00000	0,00000	0,00203
	0,00035	0,00000	0,00193	0,00000
	0,00596	0,00000	0,00999	0,00105
25 UFC	0,00099	0,00026	0,00029	0,00004
	0,00047	0,00007	0,00117	0,00003
	0,00086	0,00049	0,00028	0,00054
50 UFC	0,00112	0,00002	0,00002	0,00000
	0,00036	0,00002	0,00000	0,00001
	0,00131	0,00000	0,00000	0,00008

Continua na página 4/5

Continuação

Concentração teórica do inóculo/mL	Microrganismo			
	<i>S. aureus</i> NCTC 10788	<i>B. cepacia</i> NCTC 10743	<i>E. coli</i> NCTC 12923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027
100 UFC	0,00020	0,00000	0,00022	0,00050
	0,00013	0,00000	0,00000	0,00001
	0,00000	0,00000	0,00011	0,00002

NOTA: Para o cálculo da variância foi empregado a equação $\left(\frac{y_a - y_b}{2}\right)^2$, onde y é o logaritmo (\log_{10}) da contagem média de cada analista (A e B)

Em seguida, o desvio padrão foi calculado através da equação 1 contemplando a variância dos 48 pares de ensaios. A incerteza de medição expandida (U)

foi determinada através da equação 2, considerando um fator $k=2$, uma vez que este valor corresponde a um nível de confiança de aproximadamente 95%⁹.

(Equação 1)
$$S_{\text{repro}}(\log_{10}) = \sqrt{\frac{\text{Variância Ensaio}_1 + \text{Variância Ensaio}_2 + \dots + \text{Variância Ensaio}_{48}}{48}}$$

(Equação 2)
$$U = S_{\text{repro}} \times k$$

A somatória dos valores de variância obtidos foi 0,03128 e o valor do desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial calculado foi de $6,5 \times 10^{-4}(\log_{10})$, resultando em uma incerteza expandida (U) de $1,3 \times 10^{-3}(\log_{10})$.

Os controles de fontes de variação, tais como processos operacionais, equipamentos, condições ambientais, contribuem para minimizar os erros associados à medição de valores relacionados aos ensaios microbiológicos. O cálculo da estimativa de incerteza, embora não esteja previsto em legislações destinadas às avaliações de águas, constitui-se como importante ferramenta para a detecção de possíveis erros associados à medição de valores. Para minimizar estes erros, é importante que exista constante capacitação da equipe de analistas nas técnicas utilizadas; manutenção e calibração de equipamentos; controle e registro das condições ambientais.

Portanto, empregar o cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial, como demonstrado, pode ser uma alternativa viável e de fácil execução para ser utilizada pelos laboratórios de ensaios acreditados pela CGCRE como forma de determinar a incerteza de medição em ensaios

microbiológicos quantitativos de contagem de bactérias heterotróficas, auxiliar na detecção de possíveis fontes de erros que possam impactar nos resultados analíticos e consequentemente, atender a norma ISO/IEC 17025:2017.

FINANCIAMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo nº 17/13374-7

REFERÊNCIAS

- Grupo de Trabalho 1 do Comitê Conjunto para Guias em Metrologia (JCGM). Avaliação de dados de medição: Guia para incerteza de medição – JCGM 100:2008. Rio de Janeiro: INMETRO; 2008. 126p. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/noticias/conteudo/iso_gum_versao_site.pdf
- Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) - INMETRO. Exemplos de estimativa de incerteza de medição em ensaios microbiológicos - DOC-CGCRE-053-00. Rio de Janeiro: INMETRO; 2014. 15p. Disponível em: <http://www.inmetro.gov>

- br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio
3. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração - ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017. 3.ed. Rio de Janeiro: ABNT; 2017. 32p.
4. Biomérieux. Bioball® MultiShot 550. [acesso 2020 Jan 10]. Disponível em: <http://bioball.com/wp-content/uploads/2019/02/BIOBALL-MultiShot-550-IFU-2018-09-portugese.pdf>
5. Microbiologics. Recommended culture methods for microorganisms. [acesso 2020 Jan 10]. Disponível em: <https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=563&c=915960&h=7973622f91a75e047f37&xt=.pdf>
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 6.ed. v.2. Brasília; 2019. IF032-00. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259143/IFA+e+ESP+Pronto.pdf/1d16f9e9-affc-495b-bb8f-6806c2cef0fe)
7. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 11, de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 14 mar 2014. Seção 1(50):40-2. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0011_13_03_2014.pdf
8. American Public Health Association (APHA). *Standard methods for examination of water and wastewater*. 23th ed. Baltimore: Port City Press; 2017.
9. International Organization for Standardization (ISO). *Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*. ISO 19036:2019. Geneva: ISO; 2019. 38p.