

# Guia RELACRE

# 29

**GUIA PARA A ESTIMATIVA DE**



**INCERTEZA EM ENSAIOS**



**MICROBIOLÓGICOS DE ÁGUAS**

COMISSÕES  
TÉCNICAS



**RELACRE**

ASSOCIAÇÃO DE LABORATÓRIOS  
ACREDITADOS DE PORTUGAL

## **FICHA TÉCNICA**



TÍTULO:

**Guia RELACRE 29**

Estimativa de Incerteza em Ensaio  
Microbiológicos de Águas

EDIÇÃO: RELACRE

ISBN: 978-972-8574-43-7



# Guia RELACRE 29

EDIÇÃO: MARÇO 2016

GUIA PARA A ESTIMATIVA



DE INCERTEZA EM ENSAIOS



MICROBIOLÓGICOS DE ÁGUAS





Este documento foi elaborado pelo Grupo de Trabalho **GT8**  
**“Microbiologia”**

DA COMISSÃO TÉCNICA RELACRE **CTR07 - ÁGUAS**

O conteúdo deste documento é da responsabilidade dos especialistas, membros da referida CTR, que colaboraram na sua elaboração.

É intenção da RELACRE proceder à revisão deste documento sempre que se revele oportuno.

Na elaboração da presente edição colaboraram:

Fátima Raposo (Coordenadora)

Ana Ferraz – GLOBALAB S.A.

Célia Neto – EPAL, SA

Cristina Fava – Águas do Algarve, SA

Fátima Coimbra – Águas do Centro Litoral S.A.

Filipa Costa Ferreira - INSA

Filipa Macieira – Laboratório Análise IST

José Miranda - SIMAR – Loures/Odivelas

Margarida Valente - Águas do Norte, S.A.

Manuela Cadete

Patrícia Cruz – Águas do Norte, S.A.

Raquel Rodrigues - INSA



**ÍNDICE**

1	OBJETIVO	6
2	ÂMBITO	6
3	REFERÊNCIAS	6
4	DEFINIÇÕES	7
<b>4.1</b>	<b>Incerteza de medição</b>	<b>7</b>
<b>4.2</b>	<b>Estimativa da incerteza de medição</b>	<b>7</b>
<b>4.3</b>	<b>Reprodutibilidade Intralaboratorial</b>	<b>7</b>
<b>4.4</b>	<b>Incerteza-padrão combinada</b>	<b>7</b>
<b>4.5</b>	<b>Incerteza-padrão relativa</b>	<b>7</b>
4.5.1	Logaritmos e incerteza-padrão relativa	8
<b>4.6</b>	<b>Variância relativa</b>	<b>9</b>
<b>4.7</b>	<b>Incerteza expandida e Incerteza relativa expandida</b>	<b>9</b>
5	INTRODUÇÃO	9
6	ABORDAGEM GLOBAL PARA A DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA OPERACIONAL E COMBINADA	11
<b>6.1</b>	<b>Expressão da incerteza combinada</b>	<b>11</b>
6.1.1	Modelo de dois componentes	11
6.1.2	Variância operacional (incerteza técnica)	12
6.1.3	Variância intrínseca (incerteza da distribuição)	12
<b>6.2</b>	<b>protocolo experimental</b>	<b>12</b>
6.2.1	Variância padrão da reprodutibilidade	14
6.2.2	Variância da Distribuição (Intrínseca)	15
6.2.3	Variância operacional média	15
6.2.4	Exemplo 1: Método de contagem de colónias - cálculo com logaritmos decimal de x	15
6.2.5	Exemplo 2: Método MPN - cálculo com logaritmos decimal de x	17
<b>6.3</b>	<b>Cálculo da incerteza combinada de um resultado</b>	<b>18</b>
6.3.1	Incerteza Combinada - Contagem colónias sem confirmação	19
6.3.2	Incerteza Combinada – Contagem colónias com confirmação	19
6.3.3	Incerteza Combinada – Contagem número Mais Provável	20
7	EXPRESSÃO E UTILIZAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO	20
8	ANEXOS	21

## 1 OBJETIVO

Este guia tem como objetivo apoiar os laboratórios de ensaios microbiológicos de águas na quantificação da incerteza de medição apresentando a abordagem global definida na ISO 29201:2012.

## 2 ÂMBITO

Este guia dá orientações para a avaliação da incerteza nos ensaios microbiológicos quantitativos baseados na enumeração de partículas microbianas por cultura. Abrange todas as variantes dos métodos de contagem de colónias e da estimativa do número mais provável. Este procedimento não é aplicável a outros métodos que não sejam quantitativos.

O objetivo é especificar como se obtêm os valores da variância operacional intralaboratorial e da incerteza combinada do resultado final.

Nota 1: A variância pré-analítica da amostragem está fora do âmbito deste Guia.

## 3 REFERÊNCIAS

ISO 29201:2012, Water Quality – The variability of test results and uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods

ISO/IEC 17025:2005, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

ISO/IEC Guide 98-3:2008, Uncertainty of measurement – Part3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM\_1995)

ISO/TS 19036:2006, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations

ISO/TS 19036:2006/Amd1:2009, Measurement uncertainty for low counts

NIEMELA, S. I., Uncertainty of quantitative determination derived by cultivation of microorganisms. Helsinki: MIKES, 2003, 82p. (Publication J4/2003) ISBN 952-5209-76-8, ISSN 1235-5704. Available (viewed 2012-01-13) at:

[http://www.mikes.fi/documents/upload/J4\\_2003.pdf](http://www.mikes.fi/documents/upload/J4_2003.pdf).

EURACHEM/CITAC CG 4, Quantifying uncertainty in analytical measurement, ELLISON, S. L. R. ROSSLEIN, M., WILLIAMS, A., editors. 2nd edition, 2000. Available (viewed 2012-01-13) at: <http://www.eurachem.org/guides/pdf/QUAM2000-1.pdf>.

Nordtest Report TR 537, Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories, MAGNUSSON, B., NAYKKI, T., HOVIND, H., KRYSELL, M., editors, 2nd Edition. Espoo: Nordtest, 2004. 41p. Available (viewed 2012-01-13) at: <http://www.nordicinnovation.net/nordtestfiler/tec537.pdf>.

ISO 8199:2005, Water Quality – General guidance on the enumeration of micorganisms by culture

Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM), Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados, 1ª Edição Luso-Brasileira, 2012

## 4 DEFINIÇÕES

### 4.1 INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Incerteza de medição, de acordo com a ISO/IEC Guia 98-3:2008, é definida como um "parâmetro, associado ao resultado da medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos à mensuranda". É uma medida da imprecisão. O parâmetro é expresso como uma incerteza-padrão ou incerteza-padrão relativa.

### 4.2 ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO

De acordo com a norma ISO/IEC Guia 98-3:2008, o parâmetro pode ser avaliado por análise estatística de uma série de observações sendo designado por estimativa da incerteza do tipo A. Qualquer outro tipo de procedimento é designado por estimativa da incerteza do tipo B.

### 4.3 REPRODUTIBILIDADE INTRALABORATORIAL

A reprodutibilidade intralaboratorial é frequentemente considerada como sendo o parâmetro mais adequado da incerteza de medição (ISO/TS 19036:2006). É também conhecida como reprodutibilidade intermédia ou precisão intermédia.

A ideia é avaliar o quanto um resultado analítico pode variar se a análise for feita por outra pessoa, no mesmo laboratório, utilizando diferentes equipamentos, reagentes e condições de incubação. O valor estimado de precisão intermédia num laboratório nunca pertence a um resultado analítico, mas assume-se que dá uma estimativa geral da incerteza de um método.

### 4.4 INCERTEZA-PADRÃO COMBINADA

A incerteza-padrão combinada é a incerteza-padrão do resultado que é igual ao módulo da raiz quadrada da soma das variâncias, ponderadas de acordo com o modo como varia o resultado da medição.

### 4.5 INCERTEZA-PADRÃO RELATIVA

A fórmula para os resultados finais das análises microbiológicas envolve apenas multiplicação e divisão. Nessas condições, a incerteza-padrão combinada deve ser calculada

a partir de componentes e expressa como incerteza-padrão relativa (ISO/IEC Guide 98-3:2008).

Para ambos os tipos de estimativa A e B, o símbolo escolhido para representar a Incerteza-padrão relativa é  $u_{rel}$

Nota 2: A incerteza-padrão relativa é geralmente expressa como percentagem. O termo usualmente utilizado para esta expressão é o de Coeficiente de variação (Cv).

#### 4.5.1 LOGARITMOS E INCERTEZA-PADRÃO RELATIVA

A estimativa global da incerteza-padrão experimental é tradicionalmente feita pelo cálculo com logaritmos decimal de x. Quando se efetuam cálculos entre as diferentes estimativas de incerteza é necessário expressar todos os componentes da incerteza na mesma unidade de medição, quer seja através da conversão das incertezas padrão relativas em logaritmos decimal de x ou logaritmos em incerteza-padrão relativa.

Na maioria dos casos, a incerteza-padrão absoluta é calculada na escala de logaritmos naturais e a incerteza-padrão relativa é calculada num intervalo de escala que podem ser assumidos como numericamente iguais. Os valores calculados em logaritmos decimais de x podem ser convertidos em logaritmos naturais e vice-versa pelo uso de coeficientes apropriados.

A incerteza relativa de uma quantidade é aproximadamente igual à incerteza absoluta do seu logaritmo natural. Efetuar os cálculos em logaritmos naturais antes de calcular a incerteza-padrão é uma forma de converter os resultados em escala relativa de medição:  $u_{rel}(y) \approx u(\ln y)$ . O mesmo resultado é obtido calculando  $u_{rel}(y) = u(y)/y$ . Apesar das estimativas calculadas em intervalo de escala não serem exatamente iguais às calculadas usando logaritmos naturais, não diferem significativamente

A conversão de uma escala na outra é frequentemente necessária quando calculamos e combinamos as componentes de incerteza. A conversão de logaritmos decimal de x em logaritmos naturais (base e) é obtida através da multiplicação do módulo entre os dois sistemas. O valor do módulo é 2,30259; para efeitos práticos 2,303 ou 2,3 são aproximações adequadas. O coeficiente para converter logaritmos naturais em logaritmos decimal de x é  $1/2,30259 = 0,4343$ .

Para converter variâncias de uma escala logarítmica para outra, é usado o quadrado do fator de conversão.

De logaritmos decimais de x para logaritmos naturais:  $(2,30259)^2 = 5,3019$ .

De logaritmos naturais para logaritmos decimais de x:  $(0,4343)^2 = 0,1886$ .

#### 4.6 VARIÂNCIA RELATIVA

O quadrado da incerteza-padrão relativa é chamado de variância relativa.

#### 4.7 INCERTEZA EXPANDIDA E INCERTEZA RELATIVA EXPANDIDA

Quando o resultado do teste é usado para avaliar limites relacionados com a saúde pública ou segurança, é pertinente dar um valor da incerteza que engloba uma larga fração do “intervalo” esperado para os resultados obtidos.

O parâmetro é chamado de incerteza expandida, para o qual o símbolo é U.

O valor de U é obtido pela multiplicação da incerteza combinada pelo fator de expansão k.

$$U = ku_c(y)$$

O valor de k é tipicamente entre 2 e 3.

Numa escala relativa:

$$U_{rel} = ku_{c,rel}(y)$$

Para distribuições normais, cerca de 95% dos resultados são cobertos pelo intervalo da incerteza expandida  $\mu + U$ , onde  $\mu$  é a média e  $k = 2$ .

Quando  $k = 3$  o “intervalo” de expansão corresponde a 99% dos resultados.

## 5 INTRODUÇÃO

Os Laboratórios de ensaio são obrigados a aplicar procedimentos para a estimativa da incerteza de medição (ISO/IEC 17025:2005). Sem essa indicação os resultados de medição não podem ser comparados seja entre si ou com valores de referência (ISO/IEC Guia 98-3:2008).

Especialistas em metrologia física e química elaboraram orientações gerais para a avaliação e expressão da incerteza de medição que foram publicadas pela ISO e pela IEC na norma ISO/IEC Guia 98-3:2008. No entanto, esta norma não aborda as medições em que os valores observados são contagens.

A ênfase da ISO/IEC Guia 98-3:2008 é a "lei de propagação da incerteza", segundo o qual, a estimativa da incerteza combinada do resultado final é construída a partir de componentes separados. Este princípio é conhecido como abordagem por componentes ou como "bottom-up" ou abordagem passo-a-passo.

Tem sido sugerido que os fatores que influenciam a incerteza das contagens microbiológicas não são suficientemente bem conhecidos para a aplicação da abordagem por componente (ver ISO/TS 19036:2006). É possível que esta abordagem subestime a incerteza, pois são

perdas algumas contribuições significativas que contribuem para a estimativa da incerteza. No entanto, têm surgido novos documentos que provam que os conceitos da ISO/IEC Guia 98-3:2008 são também adaptáveis e aplicáveis às contagens.

Outro princípio que se pode aplicar na estimativa das incertezas é a abordagem de caixa-negra, também conhecida como "top-down" ou abordagem global, que é baseada na análise estatística de séries de observações repetidas do resultado final (ISO/TS 19036: 2006).

Na abordagem global não é necessário quantificar ou mesmo saber exatamente quais as causas da incerteza. De acordo com a abordagem global, justificado pelos dados de controlo de qualidade relevantes, uma vez avaliada a incerteza para um dado método, aplicado num determinado laboratório, esta pode ser aplicada de forma fiável aos resultados obtidos com o mesmo método. (EURACHEM/CITAC CG 4). É assim previsível que cada resultado analítico, que resulte de um dado método de ensaio, produza a mesma incerteza. Esta premissa é compreensível no contexto de análise química, em que a incerteza do procedimento analítico e a incerteza do resultado final da análise são, geralmente, a mesma. O princípio da abordagem global descrito no documento EURACHEM/CITAC CG4 não prevê a possibilidade de que algo único numa análise em particular, possa influenciar a incerteza.

Em análise microbiológica a incerteza total do resultado de uma análise apenas pode ser estimada após a obtenção do resultado final devido à incontável "variação sem causa", que acompanha sempre as contagens. Esta situação tanto se aplica à abordagem global como à abordagem por componentes.

A variação sem causa que acompanha as contagens aumenta significativamente quando as contagens são baixas. O modelo original de abordagem global não é adequado para contagens baixas, métodos de número mais provável (NMP) nem para os casos de confirmações parciais de um número total de colónias. Assim, é necessário e útil distinguir entre dois parâmetros de precisão: a incerteza do método (variância operacional), a qual é mais ou menos previsível, e a variação imprevisível devida à distribuição das partículas unidades formadoras de colónias (variância intrínseca).

Uma modificação da abordagem global do modelo original, que tenha em consideração estas duas fontes de incerteza está isenta da restrição das baixas contagens. Este é o modelo global detalhado neste guia.

Em teoria as duas abordagens quantitativas da incerteza (global e por componentes) devem dar o mesmo resultado porque, dependendo das circunstâncias, uma abordagem pode ser mais eficiente ou mais prática do que a outra.

Nenhuma das estratégias é, no entanto, capaz de produzir estimativas de incerteza inequívocas.

## 6 ABORDAGEM GLOBAL PARA A DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA OPERACIONAL E COMBINADA

Nos métodos microbiológicos de análise de água, a amostra é a suspensão inicial e, quando a diluição é desnecessária, também serve diretamente como suspensão final.

Um procedimento analítico microbiológico completo consiste em cinco ou seis etapas sucessivas:

- a) sub-amostras e mistura;
- b) diluição;
- c) inoculação em material e meio de cultura adequados (sementeira) da amostra concentrada ou diluída;
- d) desenvolvimento durante a incubação;
- e) contagem e possível confirmação dos organismos alvo (presumíveis).

A variabilidade operacional resulta dos efeitos destas etapas. Ao estimar a incerteza do resultado final, a incerteza devida à distribuição aleatória de partículas em suspensão é adicionalmente tomada em consideração.

### 6.1 EXPRESSÃO DA INCERTEZA COMBINADA

#### 6.1.1 MODELO DE DOIS COMPONENTES

Para efeitos práticos é suficiente considerar que incerteza dos resultados de ensaios microbiológicos resulta de dois grupos de componentes.

A incerteza combinada da medição é obtida através da combinação da variância operacional e da variância intrínseca (incerteza da distribuição).

Em contexto microbiológico ambos os desvios devem ser expressos como variância relativa (ou logarítmica). Os símbolos utilizados neste contexto são:

$$u_{c,rel}(y) = \sqrt{u_{0,rel}^2 + u_{d,rel}^2} \quad (1)$$

Onde

$u_{c,rel}(y)$  é a incerteza-padrão relativa combinada;

$u_{0,rel}$  é a variabilidade operacional relativa (incerteza-padrão relativa experimental);

$u_{d,rel}$  é a variabilidade intrínseca relativa (incerteza distribuição relativa).

A Equação (1) é aplicada na abordagem global modificada para construir a incerteza relativa combinada de medição do resultado final.

Quando um componente domina a incerteza combinada é possível omitir a menor componente. Isto é particularmente vantajoso para situações em que a variância operacional é a componente mais insignificante. Neste caso, a variância intrínseca pode ser considerada representativa da incerteza combinada, não sendo necessário trabalho experimental. A estimativa é obtida pelo próprio resultado do teste, assumindo a distribuição de Poisson ou outras distribuições à priori (por exemplo no NMP e confirmações parciais).

### **6.1.2 VARIÂNCIA OPERACIONAL (INCERTEZA TÉCNICA)**

A variabilidade operacional é a combinação de todas as incertezas associadas às etapas técnicas do procedimento analítico. Inclui a variabilidade das subamostras, da mistura e da diluição da amostra para preparação da suspensão final. Inclui ainda, os possíveis efeitos da incubação e da incerteza da leitura do resultado. As componentes da “Bias” estão também envolvidas, mas como parte de variação aleatória.

Existe apenas uma estimativa de incerteza operacional por organismo alvo, método, tipo de produto ou grupos de tipos de produtos em que o método utilizado seja exatamente o mesmo (como por exemplo águas de consumo e naturais doces, águas salinas e águas residuais). Uma vez determinada a variância operacional o seu valor é válido para o mesmo tipo de amostras até que surja uma grande mudança no equipamento, operadores ou procedimento.

### **6.1.3 VARIÂNCIA INTRÍNSECA (INCERTEZA DA DISTRIBUIÇÃO)**

A variância intrínseca é a variação inevitável, sem uma causa, que está associada à distribuição das partículas na suspensão final e no sistema de quantificação. Considera-se que as suspensões de microrganismos seguem a distribuição de Poisson. Quando a confirmação é parcial ou o método de NMP é utilizado, a variação intrínseca aumenta consideravelmente e já não segue a distribuição de Poisson.

Neste guia serão detalhadas as descrições para determinação da componente de variância intrínseca para contagens de colónias, para a contagem de colónias confirmadas e para sistemas de NMP.

## **6.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

A abordagem global assenta na estimativa da incerteza combinada do resultado final, com base na duplicação de todo o processo analítico.

A estimativa da precisão da média depende do número de amostras examinadas. Neste guia são recomendadas pelo menos 30, mas preferencialmente devem ser ensaiadas mais amostras. Sempre que possível devem ser estudadas amostras naturais.

Pode ser calculada uma primeira estimativa, provisória, da incerteza operacional após 10 amostras. O protocolo e os cálculos descritos são adequados para uma acumulação gradual de dados.

Contagens baixas e confirmações parciais devem, no entanto, ser evitadas, se possível, na fase experimental, uma vez que estas aumentam a imprecisão da estimativa da incerteza operacional. Se isto não puder ser evitado, o efeito deverá ser compensado aumentando o número de amostras estudadas.

Com uma seleção adequada de diferentes técnicos, equipamentos e condições de incubação, no ensaio inicial, a estimativa representa (equipamentos + tempo + operadores) a incerteza-padrão de reprodutibilidade intralaboratorial.

O parâmetro determinado inicialmente é a incerteza-padrão da reprodutibilidade intralaboratorial  $S_R$  (escala de logaritmos decimal de x) quando a fase experimental é realizada em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

Após a conversão de  $S_R$  na escala de logaritmos naturais por  $u_{R',rel} = 2,303S_R$  a estimativa da variância operacional relativa,  $u_{0,rel}^2$  é obtida subtraindo a variância intrínseca relativa (incerteza de distribuição),  $u_{d,rel}^2$ , da variância da reprodutibilidade intralaboratorial,  $u_{R',rel}^2$ .

$$u_{0,rel}^2 = u_{R',rel}^2 - u_{d,rel}^2 \quad (2)$$

onde

$u_{d,rel}$  é uma estimativa da incerteza-padrão relativa da distribuição (variabilidade intrínseca);

$u_{R',rel}$  é a incerteza-padrão relativa de reprodutibilidade intralaboratorial.

É expectável que a incerteza operacional média, calculada a partir de várias amostras, seja suficientemente estável para representar as futuras análises. Mas como a avaliação é baseada numa subtração esta estimativa é imprecisa. Como consequência, os valores gerados quando as contagens são baixas podem ser imprecisos ao extremo. Portanto, é aconselhável evitar baixas contagens na fase do período experimental de recolha de dados. Uma vez estimada a incerteza operacional as baixas contagens deixam de ser problema.

Quando, no futuro, se pretende apresentar a estimativa da incerteza-padrão do resultado de um teste, a incerteza operacional é combinada com a incerteza de distribuição relevante

( $u_d$ ) obtendo-se assim a incerteza combinada do resultado do teste ( $y$ ).

$$u_c^2(y) = u_o^2 + u_d^2 \quad (3)$$

onde

$u_o$  é a incerteza-padrão operacional;

$u_d$  é a incerteza de distribuição assumida.

O objetivo dos ensaios do período experimental é fornecer uma estimativa geral plausível para a incerteza operacional.

As condições de análise devem ser tão diferentes quanto possível e idealmente incluir tantas variáveis quantas possam ser encontradas no dia-a-dia de um laboratório, em termos de técnicos, lotes de meios de cultura e reagentes, equipamentos e tempo de análise.

Por cada amostra, dois operadores diferentes tomam uma porção da mesma amostra (ou da sua diluição) e analisam uma vez. Os resultados analíticos, um por cada operador, são transformados em escala de logaritmos decimal de  $x$ . Os cálculos em escala logarítmica garantem que o valor do parâmetro não é sensível ao nível de contaminação (diluição) e portanto os cálculos podem ser efetuados a partir das contagens originais.

### 6.2.1 VARIÂNCIA PADRÃO DA REPRODUTIBILIDADE

A partir dos resultados do ensaio experimental, a variância padrão da reprodutibilidade é calculada para cada amostra:

$$u_R^2 = \frac{(\lg n_{c_1} - \lg n_{c_2})^2}{2} \quad (4)$$

onde

$n_{c_1}$  é o número de colónias do primeiro replicado;

$n_{c_2}$  é o número de colónias do segundo replicado;

Para uso em outros cálculos tal como apresentado nos exemplos abaixo, deve-se ter em conta que as incertezas relevantes (operacionais, distribuição e combinadas) têm que estar na mesma escala logarítmica.

### 6.2.2 VARIÂNCIA DA DISTRIBUIÇÃO (INTRÍNSECA)

A variância intrínseca devida à distribuição de partículas, em escala de logaritmos decimal de  $x$ , é estimada para cada amostra (i) pela fórmula (5)

$$u_{d_i}^2 = \frac{2 \times 0,1886}{n_{c_{1i}} + n_{c_{2i}}} = \frac{0,1886}{\bar{n}_{c_i}} \quad (5)$$

Onde:

$\bar{n}_{c_i}$  é a média da contagem de colónias por placa na amostra i.

A média aritmética da variância de distribuição da amostra é:

$$u_d^2 = \frac{\sum_{i=1}^n u_{d_i}^2}{n} \quad (6)$$

Onde:

$n$  é o número de amostras.

### 6.2.3 VARIÂNCIA OPERACIONAL MÉDIA

A variância operacional é estimada por subtração das médias da variância de distribuição e da variância da reprodutibilidade, tendo o cuidado de ambas se encontrarem expressas na escala de logaritmos decimal de  $x$ .

$$u_o^2 = u_R^2 - u_d^2 \quad (7)$$

A subtração é feita individualmente em cada amostra, e a média da diferença calculada como a última etapa.

### 6.2.4 EXEMPLO 1: MÉTODO DE CONTAGEM DE COLÓNIAS - CÁLCULO COM LOGARITMOS DECIMAL DE X

Foram ensaiadas várias amostras, independentemente, por dois analistas. Para cada amostra, cada operador tomou uma toma (uma subamostra da amostra do laboratório) e preparou uma suspensão inicial, que foi analisada uma vez.

Cada analista usou soluções de diluição e placas de meio de um lote selecionado aleatoriamente, as placas foram colocadas a incubar em posições selecionadas aleatoriamente. As placas foram retiradas para a contagem com tempos de incubação aleatórios. Cada analista leu as suas próprias placas. Os resultados (contagem de colónias), de seis exemplos são mostrados na tabela 1.

**Tabela 1** — Cálculo com logaritmos comum – Contagem de colónias

Amostra n.º	Data	Técnico (c1)	Técnico (c2)	Resultados				Variância de reprodutibilidade ( $U^2_R$ )	Variância da distribuição ( $u^2_d$ )		Variância operacional ( $u^2_o$ )
				$n_{c1}$	$n_{c2}$	Lg $n_{c1}$	Lg $n_{c2}$	$(\text{Lg } n_{c1} - \text{Lg } n_{c2})^2 / 2$	média ( $n_{c1} : n_{c2}$ )	$(0,1886) / n_{c1}$	$(u^2_R - u^2_d)$
1	23-mar-15			5	8	0,6990	0,9031	0,0208	7	0,0290	-0,0082
2	24-mar-15			15	11	1,1761	1,0414	0,0091	13	0,0145	-0,0054
3	25-mar-15			11	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	0,0083	177	0,0011	0,0072
								<b>0,0198</b>		<b>0,0111</b>	<b>0,0086</b>

Nota: Teoricamente, a variância nunca deve ser negativa. No entanto, quando uma estimativa da variância é obtida por subtração e as variâncias experimentais são baseadas num pequeno número de replicados tal situação pode acontecer. Nesse caso, a variância operacional será considerada como 0 (zero), devendo o laboratório efetuar os seus ensaios de modo a aumentar as condições de variância.

A **variância operacional** na escala de logaritmos decimal de x é dada por  $u^2_o = u^2_R - u^2_d$

O resultado final da estimativa da incerteza operacional, é obtido a partir da média dos valores individuais (última coluna):  $u^2_o = 0,0086$

A estimativa das incertezas é expressa como incerteza-padrão relativa ou em percentagem. Para comparações entre o resultado da análise global expresso em  $u^2_o$  e incertezas relativas ou valores expressos em logaritmos naturais, os valores devem ser convertidos para a escala relativa multiplicando por 5,302.

No presente exemplo  $u^2_{o,rel} = 5,302 \times 0,0086 = 0,0456$ .

Portanto, a incerteza operacional relativa média do conjunto de seis amostras é:

$$u_{o,rel} = \sqrt{0,0456} = 0,208 \approx 21\%$$

Variância da distribuição (variância intrínseca)	$u_d^2$	0,0111	
Variância da distribuição relativa (variância intrínseca relativa)	$u_{d,rel}^2$	0,0590	( $u_d^2 * 5,3019$ ) conversão em escala logarítmica natural
Incerteza intrínseca	$u_d$	0,1055	
Incerteza intrínseca relativa	$u_{d,rel}$	24%	
Variância operacional	$u_o^2$	0,0086	
Variância operacional relativa	$u_{o,rel}^2$	0,0457	( $u_o^2 * 5,3019$ ) conversão em escala logarítmica natural
Incerteza operacional	$u_o$	0,0929	
Incerteza operacional relativa	$u_{o,rel}$	21%	

**6.2.5 EXEMPLO 2: MÉTODO MPN - CÁLCULO COM LOGARITMOS DECIMAL DE X**

Dois analistas fizeram análises, independentes, de coliformes em amostras de água, usando um método do NMP. As “trays” foram incubadas em posições aleatoriamente escolhidas nas prateleiras da estufa e empilhadas aleatoriamente. A altura máxima das pilhas era 20. Os valores do MPN ( $x_1$  e  $x_2$ ) e os seus limites de confiança ( $T_0, T_1$ ) foram obtidos a partir de tabelas fornecidas pelo fabricante. Resultados de cinco amostras são mostrados na Tabela 2

As estimativas da variância da reprodutibilidade relativa é dada por:

$$u_R^2 = \frac{(\lg x_1 - \lg x_2)^2}{2} \tag{8}$$

$x_1$  e  $x_2$  são estimativas do MPN

**Tabela 2 — Método MPN - cálculo com logaritmos comum.**

Amostra n.º	Data	Técnico (c1)	Técnico (c2)	Resultados										Variância de reprodutibilidade ( $U_R^2$ )	Variância da distribuição ( $u_d^2$ )			Variância operacional ( $u_o^2$ )			
				Inferior		Superior		$n_{c2}$	Lg $n_{c2}$	Inferior		Superior			$(\lg n_{c1} - \lg n_{c2})^2 / 2$	$\frac{u_{d1}^2}{(\lg 70,1 - \lg 11,9)(3,92)^2}$	$\frac{u_{d2}^2}{(\lg 70,2 - \lg 11,9)(3,92)^2}$		$(u_{d1}^2 + u_{d2}^2) / 2$		
				$n_{c1}$	Lg $n_{c1}$	$T_{0,1}$	Lg $T_{0,1}$			$T_{1,1}$	Lg $T_{1,1}$	$n_{c2}$	Lg $n_{c2}$							$T_{0,2}$	Lg $T_{0,2}$
1				42,9	1,6325	29,7	1,4728	62,5	1,7959	53,1	1,7251	37,5	1,5740	76,2	1,8820	0,0043	0,0068	0,0062	0,0065	-0,0022	
2				22,2	1,3464	14,1	1,1492	35,2	1,5465	28,8	1,4594	19,0	1,2788	43,9	1,6425	0,0064	0,0103	0,0086	0,0094	-0,0031	
3				25,4	1,4048	16,5	1,2175	39,4	1,5955	27,1	1,4330	17,7	1,2480	41,6	1,6191	0,0004	0,0093	0,0090	0,0091	-0,0087	
4				23,8	1,3766	15,3	1,1847	37,3	1,5717	45,3	1,6561	31,5	1,4983	65,6	1,8169	0,0391	0,0097	0,0066	0,0082	0,0309	
5				65,9	1,8189	47,2	1,6739	93,7	1,9717	50,4	1,7024	35,4	1,5490	72,5	1,8603	0,0068	0,0058	0,0063	0,0060	0,0007	
																0,0114				0,0079	0,0035

As estimativas da variância da distribuição são dadas por:

$$u_{d1}^2 = \left( \frac{\lg T_{0,1} - \lg T_{1,1}}{3,92} \right)^2$$

$$; u_d^2 = \frac{u_{d1}^2 + u_{d2}^2}{2}; u_o^2 = u_R^2 - u_d^2 \tag{9}$$

$$u_{d2}^2 = \left( \frac{\lg T_{0,2} - \lg T_{1,2}}{3,92} \right)^2$$

A variância operacional é a diferença entre as médias de  $u_R^2$  e  $u_d^2$ .

O resultado final da estimativa da incerteza operacional média, é obtido a partir da média dos valores individuais (última coluna):  $u_o^2 = 0,0035$

A estimativa global da incerteza operacional é obtida pela raiz quadrada de  $u_o = \sqrt{0,0035} = 0,0592$

A conversão da incerteza-padrão operacional na escala logarítmica natural, em incerteza operacional relativa ( $u_{o,rel}$ ) é calculada através de:

$$0,059 \times 2,303 = 0,136 = 13,6\%$$

Variância da distribuição (variância intrínseca)	$u_d^2$	0,0079	
Variância da distribuição relativa (variância intrínseca relativa)	$u_{d,rel}^2$	0,0416	( $u_d^2 * 5,3019$ ) conversão em escala logarítmica natural
Incerteza intrínseca	$u_d$	0,0886	
Incerteza intrínseca relativa	$u_{d,rel}$	20%	
Variância operacional	$u_o^2$	0,0035	
Variância operacional relativa	$u_{o,rel}^2$	0,0187	( $u_o^2 * 5,3019$ ) conversão em escala logarítmica natural
Incerteza operacional	$u_o$	0,0594	
Incerteza operacional relativa	$u_{o,rel}$	14%	

### 6.3 CÁLCULO DA INCERTEZA COMBINADA DE UM RESULTADO

Quando solicitado por um cliente ou pela entidade acreditadora, os “inputs” para a estimativa da incerteza combinada de um resultado analítico tem origem no próprio resultado ( $n_z$ ) e na incerteza operacional ( $u_o$ ).

Existem várias escalas de medição para a apresentação da incerteza combinada: escala de intervalo, escala relativa e de logaritmos naturais e escala de logaritmos decimal de x. Neste guia, serão apresentadas as escalas de logaritmos decimal de x (6.3.1 e 6.3.3) e a escala relativa e logaritmos naturais (6.3.2).

### 6.3.1 INCERTEZA COMBINADA - CONTAGEM COLÓNIAS SEM CONFIRMAÇÃO

A incerteza combinada para resultados superiores a 10 ufc é dada por:

$$u_{c(\lg)} = \sqrt{\frac{0,1886}{n_z} + u_{o(\lg)}^2} \quad (10)$$

Onde:

$u_{o(\lg)}$  é a incerteza operacional em logaritmos decimal de x

$n_z$  é o número de colónias observadas

A incerteza combinada para resultados inferiores a 10 ufc, é representada apenas pela componente intrínseca, uma vez que a componente operacional é insignificante, sendo dada por:

$$u_{c(\lg)} = \sqrt{\frac{0,1886}{n_z}} \quad (11)$$

Onde:

$n_z$  é o número de colónias observadas

### 6.3.2 INCERTEZA COMBINADA – CONTAGEM COLÓNIAS COM CONFIRMAÇÃO

A incerteza combinada relativa é dada por:

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{o,rel}^2 + \frac{1}{n_c} + \frac{n_z - n_k}{n_z n_k}} \quad (12)$$

Onde:

$n_c$  é o número total de colónias alvo presumíveis contadas

$n_z$  é o número total de colónias alvo presumíveis isoladas para confirmação

$n_k$  é o número de colónias confirmadas

### 6.3.3 INCERTEZA COMBINADA – CONTAGEM NÚMERO MAIS PROVÁVEL

A incerteza combinada para resultados superiores a 10 ufc é dada por:

$$u_{c(\lg)} = \sqrt{u_{o(\lg)}^2 + \left(\frac{\lg T_1 - \lg T_0}{3,92}\right)^2} \quad (13)$$

Onde:

$T_1$  é o limite superior de confiança de 95% do valor de NMP

$T_0$  é o limite inferior de confiança de 95% do valor de NMP

$u_{o(\lg)}$  é a incerteza operacional em logartmos decimal de x

A incerteza combinada para resultados inferiores a 10 ufc é dada por:

$$u_{c(\lg)} = \sqrt{\left(\frac{\lg T_1 - \lg T_0}{3,92}\right)^2} \quad (14)$$

## 7 EXPRESSÃO E UTILIZAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO

É requisito da ISO/IEC 17025:2005 que os laboratórios determinem a incerteza do resultado analítico. O cliente necessita, juntamente com o resultado analítico, de uma estimativa da incerteza para tomar decisões.

Se o laboratório trabalhar de acordo com este guia, deve conseguir obter uma estimativa da incerteza operacional ( $u_o$ ) para todos os métodos e tipos de produtos relevantes em condições de reprodutibilidade intralaboratorial (precisão intermédia).

Os interesses do cliente e da entidade acreditadora podem ser satisfeitos pela disponibilização dos valores da incerteza operacional.

Quando solicitado pelo cliente ou entidade acreditadora, o laboratório deverá calcular a incerteza combinada do resultado analítico de acordo com as formulas apresentadas em 6.3.

Poderá ainda calcular a incerteza combinada expandida ( $U$ ) multiplicando a incerteza combinada por um fator de expansão  $k$ :

Se  $k = 2$  corresponde a um intervalo de confiança de 95%

Se  $k = 3$  corresponde a um intervalo de confiança de 99%

Para o cliente deve ser clara a forma como a incerteza é apresentada no boletim de ensaio (incerteza combinada ou incerteza expandida).

A verificação de conformidade do resultado com os valores legais deve ser interpretada de acordo com as regras previstas na legislação.

## 8 ANEXOS

Anexo 1 - Folha de cálculo para estimativa de incerteza para contagem de colónias

Anexo 2 - Folha de cálculo para estimativa de incerteza para número mais provável (NMP)

Nota: Os modelos constantes dos anexos 1 e 2 serão disponibilizados no site da RELACRE, junto ao Guia 29.

Amostra n.º	Data	Técnico (c1)	Técnico (c2)	Resultados				Variância de reprodutibilidade (U <sup>2</sup> <sub>R</sub> )	Variância da distribuição (u <sup>2</sup> <sub>d</sub> )		Variância operacional (u <sup>2</sup> <sub>o</sub> )
				n <sub>c1</sub>	n <sub>c2</sub>	Lg n <sub>c1</sub>	Lg n <sub>c2</sub>	(Lg n <sub>c1</sub> -Lg n <sub>c2</sub> ) <sup>2</sup> /2	média (nc1: nc2)	(0,1886)/n <sub>ci</sub>	(u <sup>2</sup> <sub>R</sub> -u <sup>2</sup> <sub>d</sub> )
1	23-mar-15			5	8	0,6990	0,9031	0,0208	7	0,0290	-0,0082
2	24-mar-15			15	11	1,1761	1,0414	0,0091	13	0,0145	-0,0054
3	25-mar-15			11	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	0,0083	177	0,0011	0,0072
								<b>0,0198</b>		<b>0,0111</b>	<b>0,0086</b>

Variância da distribuição (variância intrínseca)	u <sup>2</sup> <sub>d</sub>	0,0111	
Variância da distribuição relativa (variância intrínseca relativa)	u <sup>2</sup> <sub>d,rel</sub>	0,0590	(u <sup>2</sup> <sub>d</sub> *5,3019) conversão em escala logaritmica natural
Incerteza intrínseca	u <sub>d</sub>	0,1055	
Incerteza intrínseca relativa	u <sub>d,rel</sub>	24%	
Variância operacional	u <sup>2</sup> <sub>o</sub>	0,0086	
Variância operacional relativa	u <sup>2</sup> <sub>o,rel</sub>	0,0457	(u <sup>2</sup> <sub>o</sub> *5,3019) conversão em escala logaritmica natural
Incerteza operacional	u <sub>o</sub>	0,0929	
Incerteza operacional relativa	u <sub>o,rel</sub>	21%	

**Para calcular a incerteza combinada de um novo resultado u<sub>c</sub>(y):**

Resultado superior a 10 ufc	
Resultado (n <sub>z</sub> )	$u_{c(lg)} = \sqrt{\frac{0,1886}{n_z} + u_{o(lg)}^2}$
<b>Ex: 55</b>	<b>0,1098</b>

Resultado inferior a 10 ufc	
Resultado (n <sub>c</sub> )	$u_{c(lg)} = \sqrt{\frac{0,1886}{n_z}}$
<b>Ex: 9</b>	<b>0,1448</b>

**LOW COUNTS**

**Nota:** De acordo com a ISO 29201, quando as contagens são baixas a variância operacional pode ser eliminada e a variância intrínseca considerada representativa da incerteza combinada

Incerteza combinada relativa do resultado u<sub>c</sub>(y) **25%**  
 Incerteza combinada relativa expandida **51%**

Incerteza combinada relativa do resultado u<sub>c</sub>(y) **33%**  
 Incerteza combinada relativa expandida **67%**

**Para calcular a incerteza combinada de um novo resultado em que foi necessária a confirmação de colónias u<sub>c</sub>(y):**

Número total de colónias alvo contadas presumíveis (n <sub>c</sub> )	<b>55</b>
Número total de colónias alvo isoladas para confirmação (n <sub>z</sub> )	<b>5</b>
Número de colónias confirmadas (n <sub>k</sub> )	<b>5</b>
$u_{c,rel} = \sqrt{u_{o,rel}^2 + \frac{1}{n_c} + \frac{n_z - n_k}{n_z n_k}}$	<b>0,2528</b>
Incerteza combinada relativa do resultado u <sub>c</sub> (lg)	<b>25%</b>
Incerteza combinada relativa expandida	<b>51%</b>

Amostra n.º	Data	Técnico (c1)	Técnico (c2)	Resultados										Variância de reprodutibilidade (U <sup>2</sup> <sub>R</sub> )	Variância da distribuição (u <sup>2</sup> <sub>d</sub> )			Variância operacional (u <sup>2</sup> <sub>o</sub> )		
				n <sub>c1</sub>	Lg n <sub>c1</sub>	Inferior		Superior		n <sub>c2</sub>	Lg n <sub>c2</sub>	Inferior			Superior					
						T <sub>0,1</sub>	Lg T <sub>0,1</sub>	T <sub>1,1</sub>	Lg T <sub>1,1</sub>			T <sub>0,2</sub>	Lg T <sub>0,2</sub>		T <sub>1,2</sub>	Lg T <sub>1,2</sub>				
1				42,9	1,6325	29,7	1,4728	62,5	1,7959	53,1	1,7251	37,5	1,5740	76,2	1,8820	0,0043	0,0068	0,0062	0,0065	-0,0022
2				22,2	1,3464	14,1	1,1492	35,2	1,5465	28,8	1,4594	19,0	1,2788	43,9	1,6425	0,0064	0,0103	0,0086	0,0094	-0,0031
3				25,4	1,4048	16,5	1,2175	39,4	1,5955	27,1	1,4330	17,7	1,2480	41,6	1,6191	0,0004	0,0093	0,0090	0,0091	-0,0087
4				23,8	1,3766	15,3	1,1847	37,3	1,5717	45,3	1,6561	31,5	1,4983	65,6	1,8169	0,0391	0,0097	0,0066	0,0082	0,0309
5				65,9	1,8189	47,2	1,6739	93,7	1,9717	50,4	1,7024	35,4	1,5490	72,5	1,8603	0,0068	0,0058	0,0063	0,0060	0,0007
																<b>0,0114</b>			<b>0,0079</b>	<b>0,0035</b>

Variância da distribuição (variância intrínseca)	U <sup>2</sup> <sub>d</sub>	<b>0,0079</b>
Variância da distribuição relativa (variância intrínseca relativa)	U <sup>2</sup> <sub>d,rel</sub>	<b>0,0416</b> (u <sup>2</sup> <sub>d</sub> *5,3019) conversão em escala logarítmica natural
Incerteza intrínseca	U <sub>d</sub>	<b>0,0886</b>
Incerteza intrínseca relativa	U <sub>d,rel</sub>	<b>20%</b>
Variância operacional	U <sup>2</sup> <sub>o</sub>	<b>0,0035</b>
Variância operacional relativa	U <sup>2</sup> <sub>o,rel</sub>	<b>0,0187</b> (u <sup>2</sup> <sub>o</sub> *5,3019) conversão em escala logarítmica natural
Incerteza operacional	U <sub>o</sub>	<b>0,0594</b>
Incerteza operacional relativa	U <sub>o,rel</sub>	<b>14%</b>

Para calcular a incerteza combinada de um novo resultado u<sub>c</sub>(y):

Resultado superior a 10 ufc					
Resultado (n <sub>z</sub> )	Lower		Upper		$u_{c(lg)} = \sqrt{\left(\frac{\lg T_1 - T_0}{3,92}\right)^2 + u_{o(lg)}^2}$
	T <sub>0</sub>	Lg T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	Lg T <sub>1</sub>	
Ex: 65,9	47,2	1,6739	93,7	1,9717	0,0964

Incerteza combinada relativa do resultado u<sub>c</sub>(y) **22%**  
 Incerteza combinada relativa expandida **44%**

Resultado inferior a 10 ufc					
Resultado (n <sub>z</sub> )	Lower		Upper		$u_{c(lg)} = \sqrt{\left(\frac{\lg T_1 - T_0}{3,92}\right)^2}$
	T <sub>0</sub>	Lg T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	Lg T <sub>1</sub>	
Ex: 6,2	2,4	0,3802	13,7	1,1367	0,1930

Incerteza combinada relativa do resultado u<sub>c</sub>(y) **44%**  
 Incerteza combinada relativa expandida **89%**

LOW COUNTS

Nota: De acordo com a ISO 29201, quando as contagens são baixas a variância operacional pode ser eliminada e a variância intrínseca considerada representativa da incerteza combinada