

# CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO E GARANTIA DA QUALIDADE EM ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

<b>Preparado por:</b> Comissão Consultiva do SADCAS - TLAP	<b>Aprovado por:</b> Director Executivo	<b>Data de Aprovação:</b> 2018-03-24 <b>Data de vigência:</b> 2018-04-01
---	--	---

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
1. OBJECTIVO E ÂMBITO .....	3
2. DEFINIÇÕES .....	3
3. HISTÓRICO.....	5
4. MÉTODOS .....	6
5. INOCULAÇÃO .....	8
6. ANÁLISES QUANTITATIVAS.....	9
7. CONTROLO DA QUALIDADE E GARANTIA DA QUALIDADE.....	9
8. A UTILIZAÇÃO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA E CULTURAS DE REFERÊNCIA.....	12
9. O USO DA TECNOLOGIA DE REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) .....	14
10. DIRECTRIZES PARA ASSESSORES (PALCAN: 8.6).....	15
11. REVALIDAÇÃO/REVERIFICAÇÃO .....	16
12. REFERÊNCIAS .....	16
 Apêndice A - Cálculo e Interpretação dos Números Z e Desvio Padrão Relativo .....	 18
Apêndice B - Exemplo de uma abordagem à validação do método .....	19
Apêndice C - Exemplos de fontes de incerteza para métodos de microbiologia .....	21
Apêndice D - Relação entre parâmetros de validação e métodos em microbiologia.....	22
Apêndice E - Exemplo de um formato tabelado para a elaboração de planos de validação .....	24
Apêndice F - Parâmetros de validação considerados no contexto dos métodos em microbiologia .....	25
Apêndice G - Plano de Validação/Verificação - Modelo de amostra .....	31
APÊNDICE H - REGISTO DE ALTERAÇÃO.....	36

## 1. OBJECTIVO E ÂMBITO

Este documento define os requisitos técnicos para o controlo da qualidade, garantia da qualidade e a validação de métodos em laboratórios de testes microbiológicos.

Este documento contém requisitos suplementares para o cumprimento dos requisitos da norma ISO/IEC 17025:2017. Onde quer que existam dúvidas, a ISO/IEC 17025:2017 continua a ser o documento de referência para estabelecer a competência de um laboratório para produzir medições válidas.

## 2. DEFINIÇÕES

2.1 **Precisão:** Proximidade do acordo entre o resultado de um teste e o valor de referência aceite.

2.2 **Material de Referência Certificado:** Material de referência, acompanhado de um certificado, em que um ou mais valores de propriedades são certificados por um procedimento, o qual estabelece a capacidade de efectuar a rastreabilidade para uma realização precisa da unidade em que tais valores das propriedades são expressos e, cada valor certificado é acompanhado por uma incerteza declarado a determinado nível de confiança.

2.3 **Limite de detecção (LOD):** O menor número de microrganismos que podem ser detectados, mas em números que não podem ser estimados.

2.4 **Linearidade:** Habilidade de um método para obter resultados de testes proporcionais à concentração da análise.

2.5 **Desvio negativo:** Ocorre quando o método alternativo dá um resultado negativo sem confirmação, quando o método de referência dá um resultado positivo. Este desvio torna-se um resultado falso negativo quando o resultado verdadeiro pode ser comprovado como sendo positivo.

2.6 **Desvio positivo:** Ocorre quando o método alternativo dá um resultado positivo sem confirmação, quando o método de referência dá um resultado negativo. Este desvio torna-se um resultado falso positivo quando o resultado verdadeiro pode ser provado como sendo negativo.

2.7 **Precisão:** O grau de concordância entre os resultados de testes individuais quando um método é aplicado repetidamente a mais de uma amostra homogeneizada. A precisão é geralmente expressa como desvio padrão relativo. A precisão é uma medida do grau de repetibilidade ou reprodutibilidade.

2.8 **Culturas de referência:** Termo colectivo para linhas de referência, estoques de referência e culturas de trabalho.

2.9 **Linhas de referência:** Microrganismos definidos pelo menos ao nível do género e da espécie, catalogados e descritos de acordo com as suas características e de preferência indicando a sua origem. Normalmente obtidos a partir de uma colecção nacional ou internacional reconhecida.

- 
- 2.10 **Material de referência:** Material ou substância cujos valores de propriedade são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para serem utilizados na calibragem de um aparelho, na avaliação de um método de medição ou na atribuição de valores a materiais.
- 2.11 **Método de referência:** Método rigorosamente investigado, descrevendo clara e exactamente as condições e procedimentos necessários para a medição de um ou mais valores de propriedade que se tenha demonstrado terem precisão e exactidão proporcionais ao uso pretendido e que pode, portanto, ser usado para avaliar a precisão de outros métodos para a mesma medição, particularmente ao permitir a caracterização de um material de referência. Normalmente um método padrão nacional ou internacional.
- 2.12 **Estoques de referência:** Um conjunto de culturas separadas e idênticas obtidas por uma única sub-cultura a partir da linha de referência.
- 2.13 **Veracidade relativa:** O grau de correspondência dos resultados do método em avaliação com aqueles obtidos através de um método de referência reconhecido.
- 2.14 **Robustez:** Uma medida da capacidade de um procedimento analítico de não ser afectado por pequenas, mas deliberadas variações nos parâmetros do método e fornece uma indicação de sua confiabilidade durante a utilização normal.
- 2.15 **Veracidade:** A proximidade de concordância entre o valor médio obtido a partir de uma grande série de resultados de testes e um valor de referência aceite. A veracidade é equivalente a uma ausência de "tendência", que é a diferença entre a expectativa dos resultados do teste e um valor de referência aceite e é uma medida de erro sistemático total, mas não aleatório.

É muito difícil determinar a veracidade de um método microbiológico, especialmente em uma amostra naturalmente contaminada. A forma mais apropriada de determinar a veracidade é realizar testes em vários laboratórios e depois determinar a média do resultado do grupo. Portanto, a veracidade pode ser determinada pelo uso de materiais de referência certificados ou amostras contaminadas artificialmente. Estes testes também podem ser realizados em um único laboratório, utilizando diferentes análises. Os métodos devem ser capazes de detectar ou recuperar organismos nas concentrações correctas.

- 2.16 **Repetibilidade:** Fechamento do acordo entre os resultados de medições sucessivas da mesma medida sob as mesmas condições de medição.
- 2.17 **Reprodutibilidade:** Proximidade do acordo entre os resultados das medições da mesma medição e realizadas em condições alteradas de medição.
- 2.18 **Selectividade:** A capacidade de um método para determinar com precisão e especificamente a análise de interesse na presença de outros componentes em uma matriz de amostra sob as condições declaradas no teste.

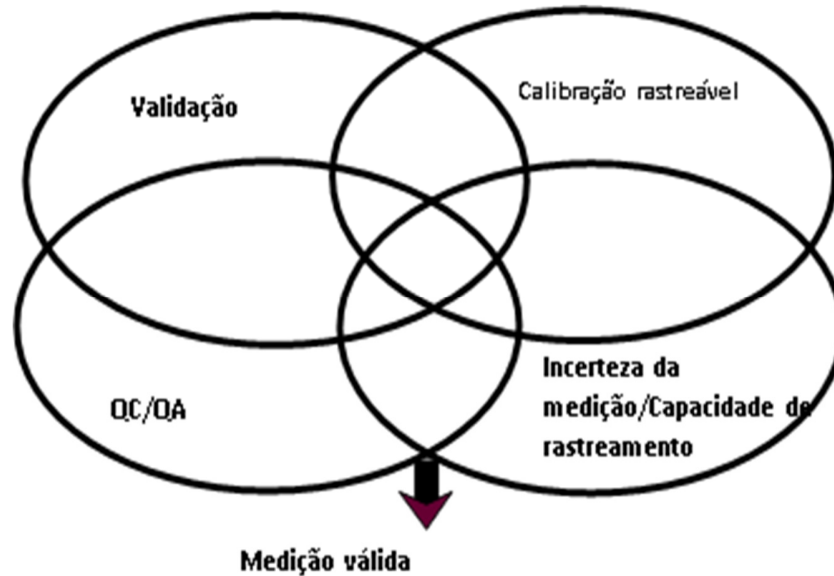
- 
- 2.19 **Sensibilidade:** A fracção do número total de culturas ou colónias positivas correctamente atribuídas na inspecção presuntiva.
- 2.20 **Especificidade:** A fracção do número total de culturas ou colónias negativas correctamente atribuídas na inspecção presuntiva.
- 2.21 **Incerteza de Medição:** Parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão dos valores que poderiam ser razoavelmente atribuídos à medida.
- 2.22 **Validação:** Confirmação, através do fornecimento de provas objectivas, de que os requisitos para uma utilização ou aplicação específica pretendida foram cumpridos.
- 2.23 **Verificação:** Confirmação, através do fornecimento de provas objectivas, de que os requisitos especificados foram cumpridos.
- 2.24 **Cultura de Trabalho:** Uma sub-cultura primária de um estoque de referência.
- 2.25 **Matriz de Amostra:** Tudo o que está presente na **amostra** típica, excepto as análises de interesse.

### 3. HISTÓRICO

Uma medição válida pode ser assegurada quando (ILAC G9):

- São utilizados métodos validados e equipamentos apropriados;
- Colaboradores qualificados e competentes realizam o trabalho;
- A comparabilidade com medições feitas em outros laboratórios é assegurada (capacidade de rastreabilidade e incerteza de medição)
- Está disponível evidência independente de execução (Teste de proficiência)
- São utilizados procedimentos bem definidos de Controlo da Qualidade e de Garantia da Qualidade, de preferência envolvendo a credenciação de terceira parte.

Figura 1: Sobreposição entre funções associadas à Rastreabilidade da Medição e à Qualidade Analítica.



## 4. METÓDOS

### 4.1 As análises microbiológicas podem ser divididas em dois grupos:

- **Análises qualitativas**, um método de análise, que demonstra a presença ou não de um microrganismo específico numa determinada quantidade de amostra de teste.
- **Análises quantitativas**, um método de análise que determina a quantidade de microrganismos presentes numa determinada quantidade de amostra, quer directamente (enumeração obtendo unidades formadoras de colónias) ou indirectamente (índices de números mais prováveis, absorvência, impedância).

### 4.2 Dentro destes dois grupos, existem três tipos de métodos.

#### 4.2.1 Métodos Padrão

Ao utilizar um método de teste padrão, o laboratório deve demonstrar sua competência para responder às características de desempenho do método. Este critério é satisfeito pela verificação do método.

#### 4.2.2 Métodos Rápidos

Métodos rápidos como os imunológicos, biológicos moleculares ou instrumentais podem ser usados como equivalentes a certos métodos padrão.

**Kits de Teste** - Quando o fabricante dos kits de teste fornece os dados de validação, o laboratório só efectua a validação secundária (verificação). Se, no entanto, não houver dados de validação disponíveis para um kit específico, a validação primária deve ser executada. É desejável a evidência de que o fabricante dos kits opera de acordo com um programa de garantia da qualidade.

Os laboratórios devem reter os dados de validação dos sistemas de testes comerciais (kits) utilizados no laboratório. Estes dados de validação podem ser obtidos através de testes colaborativos ou de dados de validação submetidos pelos fabricantes que tenham sido submetidos a uma avaliação de terceira parte (por exemplo, ACOA).

Verificar se em alguns casos (por exemplo, testes microbiológicos veterinários) que um kit de teste específico tem um desempenho diferente nas condições ambientais locais, relativamente às condições ambientais originais a que foi submetido durante a validação primária. Nesses casos, o laboratório deve conduzir a validação para provar que o kit tem um bom desempenho sob condições ambientais locais.

#### 4.2.3 Métodos não-padronizados

O termo refere-se a casos em que os métodos padrão foram modificados ou utilizados fora do seu âmbito de aplicação e a casos em que o método é desenvolvido num laboratório.

A realização da validação primária num método não-padrão requer que seja estabelecido um protocolo de validação que indique a adequação ao objectivo em comparação com um método padrão, estudos pré-colaborativos ou estudos colaborativos inter-laboratoriais.

A validação primária não é necessária:

- Quando um método não-padrão já tiver sido validado por uma organização nacional ou internacional;
- Para um método que é validado e aceite por indústrias específicas, por exemplo, a indústria de laticínios, e publicado em uma revista científica reconhecida.

Se for necessária uma versão modificada de um método para cumprir a mesma especificação do método original, então as comparações devem ser feitas usando réplicas para garantir que este seja o caso. O desenho experimental e a análise dos resultados devem ser estatisticamente válidos.

### **4.3 Validação de métodos**

Todos os métodos submetidos por laboratórios microbiológicos para acreditação devem ser validados.

O termo "validação" refere-se ao processo que é seguido para demonstrar com o fornecimento de evidências objectivas, que um método específico é adequado para a finalidade pretendida.

A extensão da validação deve reflectir, sempre que possível, às condições reais de ensaio. Por exemplo, isto pode ser conseguido utilizando uma amostra naturalmente contaminada ou um produto contaminado com um nível conhecido de microrganismos.

Quando a validação estiver completa, o laboratório precisa verificar regularmente se o desempenho documentado pode ser alcançado, por exemplo, através do uso de amostras perfuradas ou materiais de referência que incorporem matrizes relevantes.

#### **4.3.1 Validação primária**

Métodos desenvolvidos em laboratório, métodos padrão que tenham sido modificados de tal forma que o resultado final possa ser influenciado (temperatura e tempo de incubação, meios alternativos), métodos padrão utilizados fora do seu âmbito pretendido, bem como métodos rápidos, devem ser submetidos à validação primária.

Um número limitado de laboratórios desenvolve e implementa "novos" métodos microbiológicos. Portanto, não são muitos os laboratórios que têm de realizar uma validação primária dos métodos.

#### **4.3.2 Validação secundária (verificação)**

Quando um laboratório implementa um método padrão, que foi desenvolvido, e validado noutro local, somente se aplica a validação secundária (verificação).

A verificação refere-se ao processo em que é estabelecida a aplicabilidade do método a todos os produtos em teste, bem como a competência do pessoal nesse método.

O processo deve incluir evidências objectivas de que o laboratório é competente para executar o método de acordo com as características que foram publicadas e aceites.



A verificação pode ser realizada por controlos da qualidade internos e externos no laboratório, ensaios comparativos inter e intra-laboratoriais, bem como a participação em esquemas de ensaios de proficiência, quando disponíveis.

#### 4.4. Métodos aceitáveis para a validação de análises qualitativas e quantitativas

##### 4.4.1 Análises qualitativas

Os métodos de ensaio microbiológico qualitativo, tais como e onde o resultado é expresso em termos de detectado/não detectado e procedimentos de confirmação e identificação devem ser validados através da determinação, quando apropriado, da especificidade, veracidade relativa, desvio positivo, desvio negativo, limite de detecção, efeito de matriz, repetibilidade e reprodutibilidade.

A validação deve demonstrar a aplicabilidade do método específico a vários tipos de amostras, por exemplo, alimentos, água e fármacos.

De preferência devem ser usadas amostras contaminadas naturalmente (por exemplo, amostras de intoxicação alimentar), mas como estas nem sempre são fáceis de obter, as amostras perfuradas são usadas com mais frequência.

A contaminação do produto deve ser conduzida com uma cultura pura de uma linhagem.

Os microrganismos utilizados para verificação devem ser verificados quanto à pureza.

## 5. INOCULAÇÃO

- 5.1 Se for sabido que os organismos em certos tipos de amostras estão destacados (por exemplo, alimentos processados), os organismos contaminantes também devem ser destacados antes da inoculação.
- 5.1 As amostras cruas não processadas devem ser inoculadas com organismos sem destaque.
- 5.2 Cada tipo de amostra é dividido em 3 porções. Uma amostra serve como controlo negativo; uma amostra é inoculada com uma baixa concentração de amostra e uma amostra com uma alta concentração de amostra. O único requisito de aceitação para a verificação de métodos qualitativos é alcançar uma proporção de aproximadamente 50% entre resultados positivos e negativos no mesmo conjunto de amostras. Este requisito é referido como recuperação fraccionária.
- 5.3 Um baixo nível de inoculação é estabelecido no nível de detecção mais baixo do método, por exemplo, 1 - 5 cfu/25g. O nível de inoculação alto é definido em 10 - 50 cfu/25g.
- 5.4 Os níveis de inoculados que levam apenas a resultados positivos ou negativos não têm qualquer utilidade na determinação do limite de detecção mais baixo e, portanto, não satisfazem os requisitos de validação.
- 5.5 Para demonstrar especificidade e sensibilidade, uma amostra de ensaio deve ser inoculada com linhagem do microrganismo específico em teste, bem como com linhagens consideradas potencialmente competitivas.

- 5.6 Se a amostra de controlo não inoculada for positiva para os organismos a ensaiar, o teste é considerado inválido.
- 5.7 As amostras de controlo não são incluídas quando os testes de verificação são realizados em amostras contaminadas naturalmente.

## **6. ANÁLISES QUANTITATIVAS**

- 6.1 Para métodos de testes microbiológicos quantitativos, a especificidade, sensibilidade, veracidade relativa, desvio positivo, desvio negativo, repetibilidade, reprodutibilidade e o limite de determinação dentro de uma variabilidade definida devem ser considerados e, se necessário, determinados quantitativamente em ensaios. As diferenças devidas às matrizes devem ser levadas em conta ao testar diferentes tipos de amostras. Os resultados devem ser avaliados com métodos estatísticos apropriados.
- 6.2 Para diferentes tipos de amostras, preparar níveis de contaminação altos, médios e baixos, bem como uma amostra de controlo não inoculada. O nível mais baixo deve cair aproximadamente no limite de detecção, os níveis médio e alto um e dois níveis de registo mais altos, respectivamente. Os resultados das contagens obtidas devem ser convertidos em valores de registo e destacados. Ao utilizar um valor de consenso, os valores atípicos devem ser removidos através de análise estatística.

## **7. CONTROLO DA QUALIDADE & GARANTIA DA QUALIDADE**

### **7.1 Teste de Proficiência**

O teste de proficiência neste documento refere-se a comparações inter-laboratoriais, amostras de ensaio cegas analisadas pelo laboratório e esquemas de ensaio de proficiência.

É um requisito de acreditação para que os laboratórios participem em testes de proficiência necessários para o seu âmbito de acreditação. (Consultar SADCAS TR 08 "Testes de proficiência e outros requisitos de programa de comparação para laboratórios de ensaio e clínicos").

O tipo e extensão dos testes de proficiência seleccionados por um laboratório devem abordar o risco envolvido na produção de resultados que não são confiáveis.

Deve ser dada preferência aos testes de proficiência que utilizam matrizes de amostras semelhantes às amostras que são testadas pelo laboratório.

### **7.2 Controlo Interno da Qualidade**

O controlo interno da qualidade consiste em todos os procedimentos realizados por um laboratório para a avaliação contínua do seu trabalho.

O principal objectivo é assegurar a consistência dos resultados no dia-a-dia e a sua conformidade com os critérios definidos.

É necessário um programa de verificações periódicas para demonstrar que a variabilidade (isto é, entre análises e entre equipamentos e materiais, etc.) está sob controlo. Todos os testes incluídos no âmbito de acreditação do laboratório precisam ser cobertos pelo programa de controlo de qualidade.

O programa pode envolver:

- O uso de amostras cravadas
- A utilização de materiais de referência (incluindo materiais do Esquema de Proficiência);
- Teste com réplicas;
- Avaliação de réplicas de resultados de testes;
- Comparações intra-laboratoriais.

O intervalo entre estas verificações será influenciado pela construção do programa e pelo número de testes reais. Recomenda-se que, sempre que possível, os testes incorporem controlos para monitorar a execução.

Em casos especiais, um laboratório pode ser acreditado para um teste que raramente é chamado a fazer. Reconhece-se que, nesses casos, um programa de controlo da qualidade interno contínuo pode ser inadequado e que um esquema para demonstrar uma execução satisfatória que é realizada em paralelo com os testes, pode ser mais adequada.

### 7.3 O uso de meio de comunicação

#### 7.3.1 Meio de comunicação interno preparado

A execução adequada dos meios de cultura, diluentes e outros fluidos de suspensão preparados internamente deve ser verificado, quando necessário, no que diz respeito a:

- Recuperação ou manutenção de sobrevivência dos organismos alvo,
- Inibição ou supressão de organismos não visados,
- Propriedades bioquímicas (diferencial e diagnóstico),
- Propriedades físicas (por exemplo, pH, volume e esterilidade).

As matérias-primas (tanto as formulações comerciais desidratadas quanto os constituintes individuais) devem ser armazenados em condições apropriadas, por exemplo, em locais frescos, secos e escuros. Todos os recipientes, especialmente os dos meios desidratados devem ser hermeticamente fechados. Meios desidratados que estejam cozidos ou rachados ou que apresentem uma mudança de cor não devem ser utilizados. Água desionizada, destilada ou osmose inversa produzida, livre de substâncias bactericidas, inibitórias ou interferentes, deve ser usada para preparação, a menos que o método de teste especifique o contrário.

O prazo de validade dos suportes preparados, em condições de armazenamento definidas deve ser determinado e verificado.

7.4 Todos os meios (diluentes e outros fluidos em suspensão) adquiridos prontos a usar ou parcialmente completos requerem validação antes de serem usados. A avaliação do desempenho na recuperação ou sobrevivência dos organismos alvo e a inibição ou supressão de organismos não alvo precisa ser totalmente quantitativa. Atributos (por exemplo, propriedades físicas e bioquímicas) devem ser avaliados usando critérios objectivos.

7.4.1.1 Como parte da validação, o laboratório utilizador necessita de ter um conhecimento adequado das especificações da qualidade do fabricante, que incluem pelo menos o seguinte

- Nome do meio de comunicação e lista de componentes, incluindo quaisquer suplementos;
- Prazo de validade e critérios de aceitabilidade aplicados;
- Condições de armazenamento;
- Regime de amostragem/taxa;
- Verificação de esterilidade;
- Verificar o crescimento dos organismos de controlo alvo e não alvos utilizados (com as referências da sua colecção de culturas) e critérios de aceitabilidade;
- Controlos físicos e os critérios de aceitabilidade aplicados
- Prova de que a mídia suporta o crescimento de contagens muito baixas de organismos, conforme especificado por certos testes.

7.4.1.2 Os lotes de meio de comunicação devem ser identificáveis. Cada lote recebido deve ser acompanhado por provas de que cumpre a especificação da qualidade. O laboratório utilizador deve assegurar-se de que a notificação do fornecedor sobre quaisquer alterações à especificação da qualidade será recebida pelo laboratório.

7.4.1.3 Quando o fabricante dos meios de comunicação adquiridos prontos a usar ou parcialmente completos estiver coberto por um sistema da qualidade reconhecido (por exemplo, série ISO 9000 registada), a verificação pelo laboratório utilizador da conformidade dos fornecimentos com a especificação definida através da validação inicial pode ser aplicada de acordo com a expectativa de consistência. Noutras circunstâncias seriam necessárias verificações adequadas em cada lote recebido.

#### 7.4.2 **Controlo de esterilidade e contaminação**

Os controlos de esterilidade e contaminação devem ser realizados em todos os lotes de meios de comunicação. Estas verificações são realizadas incubando uma amostra dos meios a temperaturas e tempos que permitam o crescimento de microrganismos. A incubação também deve ser feita à mesma temperatura em que os meios serão utilizados. Os períodos de incubação não devem ser inferiores a 48h (à temperatura em que o meio será utilizado). É aconselhável realizar regularmente controlos de promoção do crescimento dos diluentes utilizados.

#### 7.4.3 Teste de Desempenho

Os testes de suporte ao crescimento e recuperação devem ser realizados em lotes de meios de comunicação antes do lançamento. Os testes de execução devem incluir tanto controlos positivos como negativos. Os meios devem ser testados preferencialmente em condições tão próximas daquelas em que serão utilizados.

Os detalhes dos resultados dos testes da qualidade de desempenho devem ser registados para garantir a capacidade de rastreabilidade até o número de lote do meio correspondente. Devem ser registadas as seguintes informações:

- Número médio do lote, data de preparação, data média do ensaio;
- Avaliação da esterilidade, temperatura e tempo de incubação, presença ou ausência de crescimento;
- Avaliação de desempenho (controlos positivos e negativos)
- Comentários gerais sobre a aceitação/rejeição do lote
- Assinatura e data do analista.

#### 7.4.4 Critérios de aceitação ou rejeição

Os meios de comunicação devem ter o desempenho pretendido. Os critérios para a aceitação/rejeição dos meios de comunicação devem ser detalhados num procedimento. Todos os meios que não suportam ou suprimem o crescimento, ou que não demonstram as características exigidas, devem ser rejeitados. Em circunstâncias normais, um laboratório não deve utilizar qualquer meio expirado.

Em circunstâncias em que um laboratório tem de utilizar meios expirados, é necessário demonstrar que estão em vigor medidas adequadas de controlo de qualidade para provar que os meios apoiam o crescimento antes da realização de testes e que o uso de meios expirados é negociado com o cliente. O uso de meios expirados deve levar em consideração o risco envolvido na produção de resultados não confiáveis e a respectiva aplicação dos resultados pelo cliente.

### 8. O USO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA E CULTURAS DE REFERÊNCIA

- 8.1 Os materiais de referência devem, sempre que possível, ser rastreáveis a unidades de medida SI, ou a materiais de referência certificados. Os materiais de referência internos devem ser verificados sempre que possível, técnica e economicamente.
- 8.2 As verificações necessárias para manter a confiança do estado de calibração dos padrões de referência, primários, de transferência ou de trabalho e materiais de referência devem ser realizadas de acordo com procedimentos e cronogramas definidos.
- 8.3 Os laboratórios acreditados pelo SADCAS devem ter procedimentos para manipulação, transporte, armazenamento, processamento, manutenção e uso seguro de padrões de referência e materiais de referência, a fim de evitar contaminação ou deterioração e, proteger a sua integridade.

A garantia da qualidade nos laboratórios de microbiologia não pode ser realizada sem culturas de referência devidamente armazenadas, processadas e mantidas.

#### 8.4 Materiais de referência e culturas de referência (ISO/IEC 17025:2017 cláusula 6.4.1 - vide Nota 1).

##### 8.4.1 Materiais de Referência

Os Materiais de Referência e Materiais de Referência Certificados (vide definição no Apêndice A) proporcionam uma capacidade de rastreabilidade essencial nas medições e são usados, por exemplo;

- Para demonstrar a exactidão dos resultados;
- Para calibrar o equipamento;
- Para monitorar o desempenho do laboratório;
- Para validar os métodos; e
- Para permitir a comparação de métodos.

Sempre que possível, devem ser utilizados materiais de referência em matrizes apropriadas.

##### 8.4.2 Culturas de referência

As culturas de referência são necessárias para estabelecer o desempenho aceitável dos meios (incluindo kits de teste), para validar métodos e para assistir/avaliar o desempenho em curso. A capacidade de rastreabilidade é necessária, por exemplo, ao estabelecer o desempenho dos meios para o kit de ensaio e para as validações dos métodos. Para demonstrar a capacidade de rastreabilidade, os laboratórios devem usar linhagem de referência de microrganismos obtida directamente de uma colecção de culturas nacional ou internacional reconhecida, onde estas existam. Alternativamente, podem ser utilizados derivados comerciais para os quais o laboratório tenha demonstrado que todas as propriedades necessárias são equivalentes no ponto de utilização.

Seguindo a orientação da ISO 11133-1, as linhagens de referência podem ser sub-cultivadas uma vez para fornecer estoques de referência. As verificações de pureza e bioquímica devem ser feitas em paralelo, conforme apropriado. Recomenda-se o armazenamento de estoques de referência em alíquotas ultracongeladas ou liofilizadas. As culturas de trabalho para uso rotineiro devem ser sub-culturas primárias do estoque de referência. Se os estoques de referência tiverem sido descongelados, eles não devem ser congelados de novo e reutilizados.

Os estoques de trabalho não devem ser sub-cultivados a menos que seja exigido e definido por um método padrão ou que os laboratórios possam fornecer provas documentais de que não houve alteração em nenhum bem importante. As reservas de trabalho não devem ser sub-cultivadas para substituir as reservas de referência. Os derivados comerciais de linhagem de referência só podem ser utilizados como culturas de trabalho.

- **Uma cultura de referência** é uma preparação de microrganismos que é obtida a partir de uma colecção de tipos de cultura como a ATCC.
- **Uma cultura de referência** é uma preparação de microrganismo derivada de uma cultura de referência.
- O crescimento de **culturas de estoque de trabalho** é derivado de uma cultura de estoque de referência.
- Uma **sub-cultura** é a transferência do crescimento de microrganismos estabelecidos nos meios de comunicação para meios de comunicação novos. Desenvolver uma cultura de referência ou cultura de estoque a partir do seu estado preservado (por exemplo, liofilizado) não é uma sub-cultura.

#### 8.6. **Sub-cultura e manutenção**

O armazenamento incorrecto e a sub-cultura repetida de uma cultura podem levar a alterações e mutações. Estas alterações ocorrem quando um microrganismo não consegue produzir as características conhecidas e previsíveis para as quais foi seleccionado.

Sub-cultura de culturas liofilizadas:

##### **Opção 1:**

- Para culturas liofilizadas, abra septicamente a ampola/frasco que contém a cultura;
- Suspende num meio não selectivo e riscar imediatamente o caldo na superfície de uma placa de ágar não selectiva, de forma a obter colónias únicas;
- Esta placa pode agora ser rotulada como "crescimento primário";
- Incubar à temperatura designada.
- Após a incubação, as colónias únicas são novamente transferidas para um meio de ágar não selectivo, de forma a obter colónias únicas. A placa de Petri é rotulada como "Semana 1".
- Após a incubação a cultura é armazenada a 4°C – 8°C, o crescimento é utilizado para efeitos de controlo da qualidade durante um período de sete dias.
- Após um período de sete dias, a placa "Semana 1" é rotulada em meio de ágar não selectivo "Semana 2". Continuar desta forma por um período de 4 semanas (28 dias).
- Após o ciclo de 4 semanas, uma nova cultura liofilizada é aberta.

##### **Opção 2:**

Outra opção é abrir uma cultura liofilizada e, em seguida armazenar a cultura em contas criogénicas. Um novo grânulo pode então ser cultivado a cada quatro semanas.

Orientações adicionais podem ser obtidas na ILAC-G9:2005 - 'A selecção e uso de materiais de referência'.

## 9. **A UTILIZAÇÃO DA TECNOLOGIA DE REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

Os seguintes pontos fornecem orientações sobre as precauções mais essenciais necessárias para evitar a contaminação quando se utiliza a tecnologia de Reacção em Cadeia de Polimerase.

- 9.1 O ideal é que os testes sejam executados em três ambientes laboratoriais separados. O primeiro deve ser usado exclusivamente para o armazenamento e manipulação de reagentes PCR essenciais, o material do modelo não deve ser manipulado neste ambiente. O segundo deve ser utilizado para a extracção de ácidos nucleicos e adição de ácidos nucleicos a reacções de PCR. O terceiro deve ser usado para armazenar termocicladores PCR e equipamento usado para manipular os produtos PCR. A amplificação e manipulação de produtos de PCR devem ser feitas exclusivamente no terceiro ambiente.
- 9.2 Um dos ambientes indicados em 9.1 deve ter bata de laboratório apropriada e luvas descartáveis.
- 9.3 Cada um dos ambientes indicados em 9.1 deve ter equipamento adequado (por exemplo, pipetas, pinças, termómetros, centrífugas, blocos de aquecimento, geleiras e frigoríficos).
- 9.4 Sempre que possível, cada uma das áreas indicadas em 9.1 deve ter consumíveis dedicados (por exemplo, tubos de micro combustão, pontas de pipeta, luvas, desinfectantes e canetas marcadoras).
- 9.5 O ideal é que as pontas das pipetas filtrantes sejam usadas para toda a manipulação de líquidos. Isto é particularmente importante durante a extracção do ácido nucleico e adição de ácidos nucleicos às reacções de PCR.
- 9.6 Sempre que possível, os métodos devem assegurar um fluxo unidireccional de actividades e pessoal do ambiente utilizado para preparar misturas mestre de PCR para a área de extracção do ácido nucleico e, em seguida, a área onde as reacções de PCR são executadas em termocicladores.

## **10. DIRECTRIZES PARA ASSESSORES (PALCAN: 8.6)**

- 10.1 Como é que os métodos de ensaio são seleccionados pelo laboratório?
- 10.2 O laboratório tem conhecimentos sobre validação e, tem acesso aos documentos relevantes?
- 10.3 O laboratório tem procedimentos para garantir a qualidade dos resultados de ensaios gerados pelos métodos de ensaio usados para testes de rotina/adhoc/não rotineiros?
- 10.4 O laboratório tem procedimentos para validação de métodos?
- 10.5 A quem é atribuída a responsabilidade pelas validações? O pessoal está treinado para realização de validações e na avaliação de dados brutos de validação?
- 10.6 Existe uma separação nos registos técnicos entre o desenvolvimento do método e a validação?
- 10.7 A documentação de validação está completa, incluindo os dados brutos?



- 
- 10.8 Há evidências de que o método foi transferido com sucesso para o uso rotineiro?
- 10.9 Existe algum processo para analisar os dados de desempenho gerados para métodos de uso rotineiro, e que demonstrem a aptidão contínua do cliente para o efeito?
- 10.10 O método declarado é adequado à finalidade pretendida de acordo com os critérios de aceitação do laboratório?
- 10.11 Qual é a base para a escolha dos critérios de aceitação do laboratório?

## 11. REVALIDAÇÃO/REVERIFICAÇÃO

Espera-se que o laboratório comprove continuamente que a validação/verificação ainda é actual através dos procedimentos de controlo da qualidade que incluam as características/parâmetros de desempenho do método. A revalidação/reverificação parcial ou total pode ser considerada quando:

- É introduzido um novo instrumento;
- Novas amostras com novos compostos ou novas matrizes são introduzidas (Vide Huber: 8.3);
- Um novo local com condições ambientais diferentes é usado (Vide Huber: 8.3);
- Novos produtos químicos e/ou padrões de referência são usados (Vide Huber: 8.3);
- Modificações são implementadas devido a problemas analíticos (Vide Huber: 8.3);
- Uma revisão do controlo da qualidade indica que um método estabelecido está mudando com o tempo;
- Programado de acordo com os procedimentos laboratoriais;
- Os critérios de desempenho do método estarem fora dos critérios de aceitação.

**Nota:** No caso em que um novo analista é designado para executar análises, é expectável que o laboratório garanta que o analista seja competente e atenda aos critérios de execução do método/procedimento relevante.

## 12. REFERÊNCIAS

- B. Magnusson and U. Ornemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
- ISO/IEC 17025 - General Requirements for the competence of testing and calibration laboratories. SADCAS TR 26-03 – Criteria for validation of methods used by Chemical laboratories in the Coal, Oil, Petroleum, Metals and Minerals, Food, Pharmaceuticals, water and related industries.
- Ludwig Huber, Validation and Qualification in Analytical Laboratories, second edition. Ludwig Huber Agilent Technologies. Waldbronn, Germany. <http://www.labcompliance.com>
- PALCAN Guidance for the Validation of Test Methods. Can-P-1629. November 2006. Standards Council of Canada.
- Skoog, D.A. & West, D.M. Fundamentals of Analytical Chemistry, 99<sup>th</sup> Edition, 2014.
- SLR Ellison and A Williams (eds.) Eurachem/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, (3rd ed. 2012). Available from [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
- International Vocabulary of Metrology - Basic Concepts and Associated Terms (VIM), (2nd ed. 2008) by Working Group 2 of the Joint Committee for Guides in Metrology.
- GUM: Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. ISO, Geneva (1993).
- (ISBN 92-67-10188-9) (Reprinted 1995: Reissued as ISO Guide 98-3 (2008), also available from <http://www.bipm.org> as JCGM 100:2008). <http://www.bipm.org> as JCGM 100:2008)
- VAM Projects 3.2.1 Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles Part (d) Protocol for Uncertainty evaluation from Validation data. V J Barwick and S L R Ellison. January 2000 LGC/VAM/1998/088.

## APÊNDICE A - CÁLCULO & INTERPRETAÇÃO DE Z-PONTOS e DISPOSITIVO PADRÃO RELATIVO

Para cada resultado individual, um z-ponto é calculado da seguinte forma:

$$Z = \frac{(x - X)}{esd}$$

Onde: Z = a pontuação padrão

X = o valor atribuído, a melhor estimativa do valor "verdadeiro".

x = o valor reportado

esd = estimativa de variação (valor teórico do desvio padrão)

$z < 2$  = Satisfatório

$2 < z < 3$  = Questionável

$z > 3$  = Não satisfatório

Procedimento recomendado para estimar a precisão intermediária do desvio padrão relativo dentro do laboratório (*RSD*):

- Realizar pelo menos 15 determinações em horas e datas diferentes com analistas diferentes.
- Determinar *RSD* em níveis baixos, médios e altos de contaminação por microrganismos.

Use a seguinte equação:

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} [(\log a_i - \log b_i / x_i)]^2}{2p}}$$

$(\log a_i - \log b_i) / x_i$  = Diferença entre resultados de registo duplicados

p = número de determinações duplicadas

A repetibilidade pessoal pode ser calculada usando a mesma equação, onde

p = quantidade de testes realizados pelo analista específico.

Um valor de *RSD* maior que 0,1 indica um problema.

## APÊNDICE B - EXEMPLO DE UMA ABORDAGEM PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS.

1. Uma das primeiras tarefas é decidir quão extensos devem ser os exercícios de validação. Para os métodos padrão, a cláusula 7.2.1.5 da ISO/IEC 17025:2017 afirma que *"O laboratório deve verificar se pode aplicar correctamente os métodos antes de os executar, garantindo que eles podem obter o desempenho exigido"*. Para novos métodos, a cláusula 7.2.2.1 da ISO/IEC 17025:2017 afirma que *"O laboratório deve validar métodos não normalizados, métodos desenvolvidos pelo laboratório, métodos normalizados utilizados fora do âmbito previsto ou de outra forma modificada. A validação deve ser tão abrangente quanto o necessário para satisfazer as necessidades da aplicação ou do campo de aplicação"*.

É necessária alguma forma de validação tanto para os métodos padrão como para os novos métodos. Quando um método padrão está a ser implementado, o trabalho necessário para demonstrar o *"funcionamento adequado"* será obviamente menos extenso do que quando um método totalmente novo é validado. Entretanto, enfatizar as distinções entre validações primárias e secundárias pode ser uma distração. Ao invés disso, sugere-se que a escala dos exercícios de validação seja ajustada para que os gestores de laboratório estejam confiantes de que possuem evidências objectivas mostrando que seus métodos são adequados ao propósito. Para um método padrão isto pode envolver o fornecimento de uma cópia do relatório de validação primária original e complementá-lo com evidências que o método opera dentro das especificações da validação original. Para métodos novos, a validação pode resultar numa extensa série de relatórios onde cada parâmetro de validação é investigado em detalhe.

2. No início da implementação do método, deve ser preparado um procedimento operacional padrão. o procedimento deve incluir, no mínimo, o seguinte:
  - Uma definição da medida;
  - Uma descrição do objectivo do método (por exemplo, demonstrar a conformidade com uma norma nacional);
  - Uma lista das matrizes que serão analisadas;
    - Uma lista de consumíveis que serão utilizados;
    - Uma lista de equipamentos que serão utilizados e;
    - Uma instrução passo-a-passo sobre como o método será executado.
3. As fontes de incerteza devem então ser identificadas e devem ser feitos esforços para minimizar o seu impacto. Isto é importante uma vez que os resultados dos testes de validação só são necessários se forem executados em um ambiente controlado. O Apêndice C fornece uma visão geral de algumas fontes de incerteza que podem ser consideradas durante este processo. As fontes de incerteza e as medidas de controlo associadas devem ser documentadas num breve relatório.
4. Os parâmetros de validação que são relevantes para o método devem ser identificados. O Apêndice D fornece orientações sobre a relação entre os vários métodos microbiológicos e parâmetros de validação.

5. Um plano de validação deve então ser elaborado. Isto pode ser convenientemente conseguido utilizando um formato tabulado como o apresentado no Apêndice E.
6. O plano de validação deve incluir uma descrição dos testes a serem executados. Estas descrições podem incluir detalhes das amostras a serem utilizadas, a abordagem experimental e o critério de aceitação. As orientações sobre os parâmetros de validação e sua relevância para os métodos em microbiologia são fornecidas no Apêndice F.
7. As experiências descritas no plano de validação devem ser executadas.
8. Os relatórios de validação devem ser elaborados. Os relatórios podem considerar parâmetros de validação individuais ou grupos de parâmetros, conforme considerado apropriado. Idealmente, os relatórios devem incluir os seguintes títulos:
  - Título;
  - Introdução;
  - Parâmetro (s) de validação investigado (s);
  - Critérios de aceitação;
  - Materiais e métodos;
  - Resultados e discussão;
  - Declaração sobre adequação ao fim a que se destina;
  - Localização dos dados brutos;
  - Referências

A orientação sobre relatórios de validação é apresentada no Apêndice G.

9. Uma vez que existam evidências que indiquem que o método funciona dentro dos critérios de aceitação importantes, pode ser emitido um memorando final indicando que o método é adequado para o fim a que se destina.

## APÊNDICE C - EXEMPLOS DE FONTES DE INCERTEZA DOS MÉTODOS DE MICROBIOLOGIA

Nota: A tabela abaixo foi adaptada da Agência de Protecção à Saúde (2005). Incerteza da medição nos testes. Método Padrão Nacional QSOP 4 Emissão 5.

Fonte de incerteza	
<b>Competência técnica</b>	Todas as etapas de processamento de uma amostra, operação do equipamento e leitura qualitativa ou quantitativa de testes Variação entre e dentro dos membros do pessoal
<b>Amostra</b>	Homogeneidade da fonte original da amostra Porção de teste utilizada na análise da subamostra Precisão e Exactidão do equilíbrio ou do equipamento volumétrico Distribuição não uniforme de microrganismos entre subamostra ou porções de teste Condições de tempo, transporte e armazenamento entre a amostragem e os ensaios
<b>12.1 Homogeneização da amostra</b>	Grau de heterogeneidade das suspensões feitas a partir da amostra Agrupamento de microrganismos Distribuição desigual dos microrganismos Mistura insuficiente
<b>Diluição</b>	Precisão de volumes ou pesos de fluidos de diluição pré-medidos Volume de fluido de diluição utilizado Grau de mistura em cada etapa de diluição Número de etapas de uma diluição em série Precisão, exactidão e uso apropriado do equipamento de diluição Volume das pipetas utilizadas Microrganismos aderentes às pipetas
<b>Meios e reagentes</b>	Qualidade das matérias-primas Pesagem exacta dos materiais Qualidade da água, incluindo pH e condutividade Erro pessoal na preparação e utilização de meios de cultura (incluindo Temperatura ao adicionar suplementos) Processamento e controlo de aquecimento Mistura adequada Grau de secura dos meios sólidos Desempenho de meios e reagentes, como selectividade e sensibilidade Vida útil
<b>Inoculação da mídia</b>	Volume do inóculo Equipamento utilizado na distribuição, espalhamento e filtragem Temperatura Humidade Condições atmosféricas
<b>Leitura e interpretação dos resultados</b>	Reconhecimento das colónias alvo Número de colónias contadas Diluições escolhidas para a contagem (uma diluição ou mais de uma diluição) Proporção de colónias confirmadas Propriedades dos meios de comunicação, especialmente quando se utilizam balcões automáticos

**APÊNDICE D - RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO E MÉTODOS EM MICROBIOLOGIA.**

**Tabela 1 - Parâmetros de validação relevantes para os métodos quantitativos.**

Parâmetros de validação	Métodos Quantitativos.									
	Meios de comunicação sólidos						Meio líquido		PCR em tempo real	Microscópio Contagens de slides
	Placa de descarga		Espalhe a placa		Filtragem por membranas		Fermentação múltipla tubo/poço			
	Meios não selectivos	Meios selectivos	Meios não selectivos	Meios selectivos	Meios não selectivos	Meios selectivos	Meios não selectivos	Meios selectivos	N/A	N/A
Precisão	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Selectividade	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✓	✓
Limite de detecção	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Linearidade	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Robustez	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Repetibilidade	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Reprodutibilidade	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Incerteza de Medição	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

**Tabela 2 - Parâmetros de validação relevantes para os métodos qualitativos.**

Parâmetros de validação	Métodos qualitativos com ou sem pré-enriquecimento.										
	Meios de comunicação sólidos						Meio líquido	Ponto final ou PCR em tempo real	Microscópio Presença/Ausência	Identificação o taxonómica de estirpes e isolados	
	Placa de descarga		Espalhe a chapa		Filtração por membrana						
	Meios não selectivos	Meios selectivos	Meios não selectivos	Meios selectivos	Meios não selectivos	Meios selectivos	Meios não selectivos	Meios selectivos	N/A		N/A
Precisão	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗		✗
Selectividade	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✓	✓	✗
Limite de detecção	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗
Linearidade	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
Robustez	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Repetibilidade	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Reprodutibilidade	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Incerteza de Medição	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗

**APÊNDICE E - EXEMPLO DE UM FORMATO TABELADO PARA A ELABORAÇÃO DE PLANOS DE VALIDAÇÃO.**

<b>Título do método</b>	
<b>Descrição da (s) medida (s)</b>	
<b>Descrição das matrizes tipicamente analisadas</b>	

<b>Parâmetro de validação</b>	<b>Breve descrição da abordagem experimental utilizada para investigar o parâmetro.</b>
Precisão	Descrição das amostras:
	Descrição da abordagem experimental:
	Critério de aceitação:
Selectividade	Descrição das amostras:
	Descrição da abordagem experimental:
	Critério de aceitação:
Limite de detecção (LOD):	Descrição das amostras:
	Descrição da abordagem experimental:
	Critério de aceitação:
Robustez	Descrição das amostras:
	Descrição da abordagem experimental:
	Critério de aceitação:
Repetibilidade	Descrição das amostras:
	Descrição da abordagem experimental:
	Critério de aceitação:
Reprodutibilidade	Descrição das amostras:
	Descrição da abordagem experimental:
	Critério de aceitação:
Incerteza de Medição	Descrição das amostras:
	Descrição da abordagem experimental:
	Critério de aceitação:



## APÊNDICE F - PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO CONSIDERADOS NO CONTEXTO DOS MÉTODOS EM MICROBIOLOGIA

A ISO/IEC 17025:2017 refere, mas não limita a avaliação aos seguintes parâmetros: Faixa de medição, Precisão, Polarização, Selectividade, Limite de detecção, Limite de quantificação, Linearidade, Robustez, Repetibilidade, Reprodutibilidade, Incerteza da medição, Sensibilidade cruzada contra interferência da matriz. Segue-se que estes parâmetros devem ser considerados no planeamento de testes de validação. Os pontos abaixo fornecem informações sobre como os parâmetros de validação podem ser interpretados para métodos em microbiologia.

Parâmetro	Parâmetro considerado no contexto dos métodos de microbiologia	Exemplos hipotéticos para ilustrar a investigação prática dos parâmetros de validação.
<p><b>Exactidão:</b> proximidade do acordo entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite</p>	<p>Para os métodos microbiológicos existem desafios óbvios associados à determinação do verdadeiro número de organismos numa amostra. Portanto, a melhor estimativa do valor verdadeiro terá que ser usada com frequência. Isto pode ser derivado de:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Um certificado de análise para um material de referência quantificado,</li> <li>2) O valor consensual de um esquema de teste de proficiência ou</li> <li>3) O resultado de um método de referência alternativo. Em última análise, a selecção de um valor verdadeiro exigirá um elemento de julgamento por parte do laboratório. Uma vez que o valor de referência aceite tenha sido seleccionado, a precisão pode ser expressa usando a fórmula abaixo.</li> </ol> $\text{Exactidão} = \frac{\text{Número de organismos alvos detectados}}{\text{Valor de referência aceite}} \times 100$ <p>Ao redigir relatórios de validação, seria ideal documentar qualquer preconceito observado. O enviesamento pode ser considerado como o erro sistemático de medição ou a sua estimativa, em relação a um valor da quantidade de referência. (VIM-3ª edição, vocabulário internacional ISO de termos básicos e gerais em metrologia).</p>	<p>As unidades liofilizadas de um material de referência certificado são utilizadas para espigar <i>E. coli</i> em dez amostras de água potável. O certificado de análise do material de referência indica que cada unidade liofilizada contém 100 organismos de <i>E. coli</i>. Se uma média de 95 <i>E. coli</i> /100mL fosse detectada nas dez amostras, a precisão poderia ser expressa da seguinte forma.</p> <p>O número médio de <i>E. coli</i> detectado foi de 95 ufc/100mL</p> <p>A melhor estimativa do valor real é 100cfu/100mL.</p> $\text{Exactidão} = \frac{95}{100} \times 100 = 95\%$
<p><b>Selectividade:</b> A capacidade de um método para determinar com precisão e especificamente a</p>	<p>Para os métodos microbiológicos, a capacidade de um método para determinar com precisão e especificamente a análise de interesse pode ser melhor expressa usando os conceitos de sensibilidade e especificidade abaixo.</p>	<p>Um método que utiliza filtração por membrana e meios cromogénicos selectivos é utilizado para quantificar <i>E. coli</i> em dez amostras de água superficial de 100mL. Um total de 100 colónias foi contado.</p>

Parâmetro	Parâmetro considerado no contexto dos métodos de microbiologia	Exemplos hipotéticos para ilustrar a investigação prática dos parâmetros de validação.
<p>análise de interesse na presença de outros componentes em uma matriz de amostra sob as condições declaradas no ensaio. Guia Eurachem (1998). (Adequação a Métodos Analíticos). Um guia de laboratório para validação de métodos e tópicos relacionados. Direito de autor LGC (Teddington) Ltd 1998</p>	<p>Sensibilidade é a proporção de alvos positivos (colónias, tubos, poços) correctamente atribuídos pelo método.</p> $\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Contagem verdadeira}}{\text{Contagem positiva verdadeira} + \text{Contagem falsa}}$ <p>A especificidade é a proporção de alvos negativos (colónias, tubos, poços) correctamente atribuídos pelo método.</p> $\text{Especificidade} = \frac{\text{Verdadeira contagem negativa}}{\text{Contagem negativa verdadeira} + \text{Contagem falsa}}$	<p>Setenta das colónias tinham um hipotético fenótipo de <i>E. coli</i>. Destas 60 foram confirmadas como <i>E. coli</i> usando testes bioquímicos (verdadeiros positivos) enquanto 10 foram encontradas como sendo de outra espécie (falsos positivos). Trinta colónias não tinham um fenótipo típico de <i>E. coli</i>. Destas 25 foram encontradas como sendo de outra espécie (verdadeiros negativos) enquanto 5 demonstraram ser <i>E. coli</i> usando testes bioquímicos (falsos negativos).</p> <p>Do exemplo acima a contagem verdadeira positiva foi 60 e a falsa contagem negativa foi 5. Portanto Sensibilidade = 60 / (60 + 5) = 0.92</p> <p>Do exemplo acima a contagem verdadeira negativa foi 25 e a contagem falsa positiva foi 10. Portanto Especificidade = 25 / (25+10) = 0.71</p>
<p><b>Limite de detecção (LOD):</b> O menor número de microrganismos que podem ser detectados, mas em números que não podem ser estimados. EA Guide EA-04/10: 2002, Acreditação em laboratórios microbiológicos</p>	<p>As tentativas para determinar o LOD para métodos microbiológicos são complicadas pelas dificuldades associadas à preparação de baixas concentrações de organismos alvo.</p> <p>Os pontos assumem que os microrganismos de uma matriz perfeitamente mista têm uma distribuição de <i>Poisson</i>.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• "A incerteza aleatória aumenta rapidamente à medida que a contagem das colónias diminui..."</li> <li>• "Na faixa de contagem abaixo de cerca de dez, que por acaso é de considerável interesse para a saúde pública, as medições únicas são tão imprecisas que dificilmente podem ser caracterizadas como melhores do que semi-quantitativas".</li> <li>• "Em concentrações muito baixas de partículas, todos os métodos microbiológicos, MPN e contagem de colónias incluídas, tornam-se essencialmente métodos P/A".</li> </ul>	<p>Um material de referência comercial liofilizado é obtido com uma contagem média de 30 <i>E. coli</i> por unidade. O material é utilizado para perfurar dez amostras de 100mL de água. A <i>E. coli</i> é então enumerada nas amostras usando um ensaio de fermentação em tubos múltiplos.</p> <p>Se a <i>E. coli</i> for detectada em cada uma das dez amostras, pode-se afirmar que o método demonstrou a capacidade de detectar o organismo alvo a uma concentração de 30 <i>E. coli</i> por 100mL. Também pode ser afirmado que o limite de detecção real pode ser menor, mas não pode ser investigado devido a restrições práticas em torno da preparação precisa de amostras perfuradas com concentrações de <i>E. coli</i> abaixo de 30 organismos por amostra.</p>

Parâmetro	Parâmetro considerado no contexto dos métodos de microbiologia	Exemplos hipotéticos para ilustrar a investigação prática dos parâmetros de validação.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>"Números de colónia como 20, 25 ou 30 têm sido tradicionalmente considerados os mais baixos estatisticamente confiáveis".</li> </ul> <p>Dados os desafios associados à preparação de baixos números de microrganismos, experimentos que tentam demonstrar um DBO abaixo de 30 organismos podem não gerar resultados estatisticamente significativos.</p>	
<p><b>Linearidade:</b> Habilidade de um método para obter resultados de teste proporcionais à concentração da análise. Eurachem Guide (1998). (A Adequação aos Métodos Analíticos). Um guia de laboratório para validação de métodos e tópicos relacionados. Copyright LGC (Teddington) Ltd 1998</p>	<p>Ao executar métodos para avaliar a linearidade pode ser apropriado definir simultaneamente o limite superior de trabalho do método. Essencialmente, esta seria a maior concentração de organismos alvo numa amostra que se enquadra na faixa linear dos métodos.</p>	<p>Um material de referência liofilizado e quantificado foi utilizado para perfurar seis amostras de 100mL de água potável. A quantidade de material de referência adicionado foi ajustada para que as concentrações de <i>E. coli</i> abrangessem uma faixa consistente com o objectivo pretendido do método.</p> <p>A <i>E. coli</i> foi enumerada em cada amostra. Estes resultados foram traçados em relação à quantidade de material de referência perfurado em cada amostra. Um programa de planilhas comercial foi usado para atribuir uma linha de tendência linear ao conjunto de dados. Uma distribuição aleatória sobre a linha de tendência confirmou a linearidade do método. Uma tendência sistemática de pontos de dados longe da linha de tendência teria indicado um desvio da linearidade.</p>
<p><b>Robustez:</b> Uma medida da capacidade de um procedimento analítico de não ser afectado por pequenas, mas deliberadas variações nos parâmetros do método e fornece uma indicação de</p>	<p>Apesar dos esforços para executar os métodos de forma consistente, haverá sempre ligeiras variações nas condições de teste. No contexto da microbiologia, dois dos parâmetros mais importantes são o tempo de incubação e a temperatura de incubação. Outros incluem pequenas diferenças na concentração dos meios preparados, idade dos meios utilizados e tempo de retenção da amostra. Para qualquer método é necessário um grau de julgamento para identificar os parâmetros experimentais que podem influenciar os resultados.</p>	<p>Um método está sendo validado para a identificação de <i>E. coli</i> em amostras de água não tratada usando tecnologia de filtração por membrana e um meio comercialmente disponível. O fabricante do meio sugere que a incubação deve prosseguir por um período de 20 a 24 horas.</p> <p>Uma experimentação para demonstrar a robustez do tempo de</p>

Parâmetro	Parâmetro considerado no contexto dos métodos de microbiologia	Exemplos hipotéticos para ilustrar a investigação prática dos parâmetros de validação.
<p>sua confiabilidade durante a utilização normal. Eurachem Guide (1998). (Adequação para fins de Métodos Analíticos). Um guia de laboratório para validação de métodos e tópicos relacionados. Direitos de autor LGC (Teddington) Ltd 1998</p>	<p>Uma vez identificadas as principais variáveis experimentais, deve ser definida a medida em que se espera que estas variem (por exemplo, o tempo de incubação pode variar entre 20 e 24 horas). As experimentações de validação devem então ser conduzidas para examinar o impacto da variável. O conceito é melhor ilustrado com um exemplo de tempo de incubação.</p>	<p>incubação pode ser executada da seguinte forma.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• São recolhidas trinta amostras de água bruta.</li> <li>• Cada amostra é dividida de modo a haver dois conjuntos equivalentes.</li> <li>• O primeiro conjunto é processado e incubado durante 20 horas.</li> <li>• O segundo conjunto é processado e incubado durante 24 horas.</li> <li>• Um teste estatístico, como um <i>Student t-test</i>, pode ser utilizado para comparar os dois tempos de incubação.</li> <li>• O método pode ser considerado robusto se não houver diferença significativa nos resultados para os dois tempos de incubação.</li> </ul>
<p><b>Repetibilidade:</b> Fechamento do acordo entre os resultados de medições sucessivas da mesma medida sob as mesmas condições de medição. [VIM: 1993 ISO I vocabulário Internacional de termos básicos e gerais de metrologia].</p>	<p>A repetibilidade dá uma indicação do grau de variação nos resultados que podem ser esperados quando um analista executa um método num curto espaço de tempo utilizando os mesmos consumíveis, meios e equipamentos.</p> <p>É importante reconhecer que para os métodos de microbiologia a repetibilidade será um componente da reprodutibilidade. Portanto, se a reprodutibilidade tiver sido cuidadosamente examinada e considerada aceitável, pode haver pouco valor em estimar a repetibilidade do método separadamente.</p>	<p>A repetibilidade pode ser estimada utilizando a mesma abordagem que a prevista para a reprodutibilidade abaixo. Contudo, a variação das condições experimentais deve ser minimizada tanto quanto possível. O mesmo analista deve executar todo o trabalho usando um conjunto de consumíveis e instrumentos em um curto espaço de tempo.</p>
<p><b>Reprodutibilidade:</b> Proximidade da concordância entre os resultados das medições da mesma medida realizada</p>	<p>A reprodutibilidade dá uma indicação do grau de variação nos resultados que podem ser esperados quando diferentes analistas executam um método em diferentes momentos utilizando diferentes lotes de consumíveis, meios e equipamentos.</p>	<p>Exemplo de um ensaio hipotético para determinar o desvio padrão relativo da reprodutibilidade (RSDR) para um método quantitativo usando amostras divididas. Este exemplo foi adaptado da Agência de</p>

Parâmetro	Parâmetro considerado no contexto dos métodos de microbiologia	Exemplos hipotéticos para ilustrar a investigação prática dos parâmetros de validação.																																
sob condições de medição alteradas. [VIM: 1993 ISO vocabulário internacional de termos básicos e gerais de Metrologia].	Devido à natureza labial dos microrganismos, as mesmas amostras não podem tipicamente ser armazenadas durante um longo período de tempo e analisadas utilizando diferentes instrumentos, análises e consumíveis. Isto pode ser parcialmente superado expressando a reprodutibilidade como um desvio padrão relativo (RSD) derivado dos resultados para amostras divididas. O conceito é ilustrado no exemplo.	<p>Protecção à Saúde (2005) <i>National Standard Method QSOP 4</i> Edição 5 Apêndice A. Recomenda-se que a referência original seja consultada para maiores detalhes sobre a metodologia e equações utilizadas.</p> <p>A experiência considera um método utilizado para enumerar <i>E. coli</i> em amostras de água. O método dura mais de quatro dias. Em cada dia uma única amostra de água é recolhida e dividida em duas alíquotas. As alíquotas são analisadas separadamente com tanta variação nas condições analíticas quanto permitido pelo método (por exemplo, diferentes análises, diferentes consumíveis e diferentes equipamentos). Os logaritmos comuns (log10) são tomados para as contagens. O desvio padrão relativo RSDR é determinado para cada contagem emparelhada. Um conjunto de dados hipotético é apresentado abaixo.</p> <p><b>Resultados para amostras divididas</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Dia</th> <th rowspan="2">Amostra</th> <th colspan="2"><i>E. coli</i> cfu/100ml</th> </tr> <tr> <th>Resultado da divisão 1</th> <th>Resultado da divisão 2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>1</td> <td>1089.00</td> <td>1211.0</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>2</td> <td>122000.00</td> <td>142000</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>3</td> <td>32500.00</td> <td>29000.</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>4</td> <td>28000.00</td> <td>35020.</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>Os logaritmos comuns (log10) são e dos dados acima. Os desvios padrão são então calculados para cada par</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Dia</th> <th rowspan="2">Amostra</th> <th colspan="2">Log10 valores para contagens</th> </tr> <tr> <th>dividido 1</th> <th>dividido 2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>1</td> <td>3.037028</td> <td>3.083144</td> </tr> </tbody> </table>	Dia	Amostra	<i>E. coli</i> cfu/100ml		Resultado da divisão 1	Resultado da divisão 2	1	1	1089.00	1211.0	2	2	122000.00	142000	3	3	32500.00	29000.	4	4	28000.00	35020.	Dia	Amostra	Log10 valores para contagens		dividido 1	dividido 2	1	1	3.037028	3.083144
Dia	Amostra	<i>E. coli</i> cfu/100ml																																
		Resultado da divisão 1	Resultado da divisão 2																															
1	1	1089.00	1211.0																															
2	2	122000.00	142000																															
3	3	32500.00	29000.																															
4	4	28000.00	35020.																															
Dia	Amostra	Log10 valores para contagens																																
		dividido 1	dividido 2																															
1	1	3.037028	3.083144																															

Parâmetro	Parâmetro considerado no contexto dos métodos de microbiologia	Exemplos hipotéticos para ilustrar a investigação prática dos parâmetros de validação.				
		2	2	5.086360	5.152288	0.009106
		3	3	4.511883	4.462398	0.007798
		4	4	4.447158	4.544316	0.015281
		<p>Uma estimativa da reprodutibilidade combinada da RSDRC é obtida pela determinação da média quadrática dos desvios padrão relativos (RSDR) para cada par. Uma estimativa RSDRC de 0.011 seria obtida usando os dados das tabelas acima.</p>				
<p><b>Incerteza de Medição:</b> Parâmetro associado ao resultado de uma medida que caracteriza a dispersão dos valores que poderiam ser razoavelmente atribuídos à medida Guia Eurachem (1998). (Adequação aos Métodos Analíticos). Um guia de laboratório para validação de métodos e tópicos relacionados. Copyright LGC (Teddington) Ltd 1998</p>	<p>EA Guide EA-04/10: 2002, <i>Acreditação em Laboratórios de Microbiologia</i>) faz os pontos-chave que contextualizam as estimativas de incerteza em microbiologia.</p> <p>EA Guide EA-04/10: 2002, A cláusula 5.2 diz: "Os testes microbiológicos geralmente entram na categoria dos que impedem o cálculo rigoroso, metrológico e estatisticamente válido da incerteza da Medição. É geralmente apropriado basear a estimativa da incerteza apenas nos dados de repetibilidade e reprodutibilidade, mas idealmente incluindo o viés (por exemplo, dos resultados do esquema de testes de proficiência)".</p> <p>EA Guide EA-04/10: 2002, cláusula 5.4 diz: "O conceito de incerteza não pode ser aplicado directamente aos resultados de testes qualitativos, como os de testes de detecção ou a determinação de atributos para identificação. No entanto, fontes individuais de variabilidade, por exemplo, a consistência do desempenho do reagente e a interpretação do analista, devem ser identificadas e demonstradas como estando sob controlo".</p> <p>O exemplo fornecido ilustra como uma estimativa de incerteza pode ser derivada de dados de reprodutibilidade.</p>	<p>Este exemplo foi adaptado da Agência de Protecção à Saúde (2005) Método de Padrão Nacional Method QSOP 4 Edição 5 Apêndice A. Ele ilustra como uma estimativa da Incerteza da Medição (UM) pode ser derivada dos dados de reprodutibilidade apresentados no exemplo acima. Ele usa um cenário hipotético onde um resultado foi obtido para <i>E. coli</i> em água de 6,76 x 10<sup>4</sup> cfu/100mL.</p> <p>A seguinte fórmula é usada para determinar a incerteza para um determinado resultado.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Alta estimativa UM = log<sub>10</sub> (result) + k x RSD<sub>RC</sub></li> <li>Baixa estimativa UM = log<sub>10</sub> (result) - k x RSD<sub>RC</sub></li> </ul> <p>Os seguintes dados são substituídos na equação UM.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>O resultado é 6.76 x 10<sup>4</sup> cfu/100mL.</li> <li>o RSD<sub>RC</sub> do exemplo de reprodutibilidade acima foi de 0.011.</li> <li>É seleccionado um factor de cobertura (k) de 2 (Vide Agência de Protecção da Saúde (2005) para mais orientações sobre a selecção de factores de cobertura).</li> </ul>				

Parâmetro	Parâmetro considerado no contexto dos métodos de microbiologia	Exemplos hipotéticos para ilustrar a investigação prática dos parâmetros de validação.
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta estimativa <math>UM = \log_{10}(6.76 \times 10^4) + 2 \times 0.011 = 4.8519</math></li> <li>• Baixa estimativa <math>UM = \log_{10}(6.76 \times 10^4) - 2 \times 0.011 = 4.8079</math></li> </ul> <p>O resultado acima fornece uma estimativa de incerteza na escala log10. Se for necessário um resultado na escala de contagem natural, então a análise desses dois valores deve ser determinada da seguinte forma</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta estimativa <math>UM = 10^{4.8519} = 7.11 \times 10^4 \text{ cfu}/100\text{mL}</math></li> <li>• Baixa estimativa <math>UM = 10^{4.8079} = 6.43 \times 10^4 \text{ cfu}/100\text{mL}</math></li> </ul>

**APÊNDICE G - PLANO DE VALIDAÇÃO/VERIFICAÇÃO - MODELO DE AMOSTRA**

Título do Método:	
Descrição da (s) medida (s) :	
Critérios de desempenho de verificação/validação:	
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Repetibilidade</li> <li>2. Precisão intermediária</li> <li>3. Reprodutibilidade</li> <li>4. Viés/veracidade</li> <li>5. Incerteza da medição</li> <li>6. Precisão</li> <li>7. Selectividade/sensibilidade/especificidade</li> <li>8. Linearidade</li> <li>9. Robustez</li> <li>10. Limite de determinação (LOD)</li> <li>11. Limite de quantificação (LOQ)</li> <li>12. Desvio negativo</li> <li>13. Desvio positivo</li> </ol>

Indique por meio de um X, o que for aplicável

**1. Descrição do método**

Título do método:	
Análise/Medida:	
Princípio do método ou princípio geral das técnicas:	
Tipo de amostra primária (especificar a matriz: água, alimentos, etc.):	
Tipo de recipiente, aditivos (especificar o tipo de recipiente: tubo/aditivo/garrafa/mídia, cotonete, etc.):	
Pré-tratamento da amostra: métodos de pré-tratamento da amostra (centrifugação, diluição, acidificação, alcalinização, extração, etc.):	
Unidades: modo de expressão do resultado (cfu/ml, g, razão etc.):	
Critérios de interpretação (intervalos de referência, critérios de definição de origem, valores limiares, etc.)	
Código do laboratório/ ID da amostra (se existir):	
Equipamento utilizado: marca, modelo, referência, número de identificação, etc.	
Reagente utilizado: referência, fornecedor, data de validade:	
Material de calibração (referências): conexão metrológica	



## 2. Aplicação do método

Operador (es) qualificado (s) e reconhecido (s) competente (s) tendo realizado a verificação/validação do método: identidade do operador	
Procedimento de validação/instrução/procedimento operacional: referência e versão do procedimento utilizado	
Referência e versão do procedimento utilizado:	
Período de estudo: especificar datas de: xx/xx/xx a xx/xx/xx, especificar se os resultados anteriores são repetidos	
Data da primeira utilização: especificar xx/xx/xx	

## 3. Pontos críticos/controlo de risco

5M	Pontos críticos	Elementos a considerar	Meios de competência (formação de pessoal, verificação experimental...) /documentos (procedimento, instrução, registo, ...) com referências ao QMS do laboratório	
Material (amostras)	Identidade	Formação e informação do pessoal	Procedimento de identificação do laboratório	
	Tipo de recipiente	Instruções para a amostragem de recipientes	Critérios de instrução para aceitação/recusa	
	Natureza e volume da amostra	Verificação no recebimento		
	Tempo e temperatura antes do tratamento analítico	Gestão logística (condições de transporte)		
	Pré-tratamento: centrifugação, diluição ...	Centrifugação, condições de diluição...	Centrifugação, critérios de diluição	
	Interferências	Treinamento de amostradores, inspeção no recebimento	Instrução de formação de pessoal	
	Material (reagentes)	Armazenamento e condições de utilização	Metrologia de tubos (mapeamento e monitoramento de temperatura)	Rastreabilidade metrológica
		Gestão de inventário	Aceitação ao receber os reagentes	Incluindo em cada entrega
Reconstituição de reagentes, normas, controlos		Pipetas de controlo metrológico	Instrução de reconstituição	

5M	Pontos críticos	Elementos a considerar	Meios de competência (formação de pessoal, verificação experimental...) /documentos (procedimento, instrução, registo, ...) com referências ao QMS do laboratório
Material (equipamento)	Qualidade da água	Medição da resistividade / esterilidade	Rastreabilidade das Verificações
	Monitorização de derivações	Periodicidade das manutenções Controlo dos equipamentos (monitorização metrológica, ligação,)	Registos de manutenção Rastreabilidade Metrológica, CIQ / EEQ
	Contaminação	Respeito pelas condições operacionais do fornecedor	Bibliografia e/ou registo do teste no local
	Configuração do computador a bordo,	Configuração, calibração, conexões, arquivamento de dados,	Gravações de jogos de teste
Método	Limites do método (detecção, quantificação, linearidade, interferências,)	Limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, interferências, Sensibilidade, especificidade	
	Incertezas de medição	Cálculo de incertezas de medição (não quantificáveis para métodos qualitativos)	

5M	Pontos críticos	Elementos a considerar	Meios de competência (formação de pessoal, verificação experimental...) /documentos (procedimento, instrução, registo, ...) com referências ao QMS do laboratório
Condições ambientais	Condições de armazenamento e utilização de reagentes (temperatura, humidade...)		
	Requisitos ambientais para o equipamento ou operador	Requisitos ambientais para o equipamento ou operador Condições ambientais (estático e/ou dinâmico ao longo do tempo)	Ambiente de leitura de resultados Requisitos de equipamento / manual do utilizador Registos das condições ambientais
Pessoal (trabalhadores)	Competência e manutenção da competência do pessoal	Formação e avaliação das competências do pessoal, plano de formação.	Registos de habilidades do pessoal,

		Disponibilidade de pessoal para assegurar o cumprimento do procedimento (por exemplo, testes de leitura subjectiva).	Rastreabilidade das estações de trabalho
--	--	--	--

**5. Desempenho da avaliação do método**

<b>Parâmetro de validação</b>	<b>Breve descrição da abordagem experimental utilizada para investigar o parâmetro</b>
Precisão	Descrição das amostras
	Descrição da abordagem experimental
	Critério de aceitação
	Resultados
	Conclusão
Selectividade	Descrição das amostras
	Descrição da abordagem experimental
	Critério de aceitação
	Resultados
	Conclusão
Limite de detecção (LOD)	Descrição das amostras
	Descrição da abordagem experimental
	Critério de aceitação
	Resultados
	Conclusão
Limite de quantificação (LOQ)	Descrição das amostras
	Descrição da abordagem experimental
	Critério de aceitação
	Resultados
	Conclusão
Robustez	Descrição das amostras
	Descrição da abordagem experimental
	Critério de aceitação
	Resultados
	Conclusão
Repetibilidade	Descrição das amostras
	Descrição da abordagem experimental
	Critério de aceitação
	Resultados
	Conclusão
Precisão Intermediária	Descrição das amostras
	Descrição da abordagem experimental
	Critério de aceitação
	Resultados
	Conclusão
Reprodutibilidade	Descrição das amostras
	Descrição da abordagem experimental
	Critério de aceitação
	Resultados
	Conclusão

---

Incerteza da medição	Descrição das amostras
	Descrição da abordagem experimental
	Critério de aceitação
	Resultados
	Conclusão

**6. Conclusão/declaração sobre a adequação ao fim a que se destina**

**7. Assinatura e data do Gestor Técnico/Analista**

**APÊNDICE H - REGISTO DE ALTERAÇÕES**

Estado da revisão	Alteração			Aprovado por	Data de vigência
	Pág. Nr.	Cláusula	Descrição da alteração		
Edição 1	-	-	-	SADCAS CEO	2018-03-24