

Estimativa de Incerteza de Medição em Ensaio de Contagem de Células Somáticas por Citometria de Fluxo em Leite Bovino Cru



ISSN 1516-8840

Dezembro, 2015

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos401

Estimativa de Incerteza de Medição em Ensaio de Contagem de Células Somáticas por Citometria de Fluxo em Leite Bovino Cru

*Ricardo Alexandre Valgas
Daiane Placido Torres*

Embrapa Clima Temperado
Pelotas, RS
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: BR 392, Km 78

Caixa postal 403, CEP 96010-971 - Pelotas/RS

Fone: (53) 3275-8100

www.embrapa.br/clima-temperado

www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê de Publicações da Unidade Responsável

Presidente: *Ana Cristina Richter Krolow*

Vice-presidente: *Enio Egon Sosinski Junior*

Secretária-Executiva: *Bárbara Chevallier Cosenza*

Membros: *Ana Luiza Ana Luiza Barragana Viegas, Fernando Jackson, Marilaine Schaun Pelufê, Sonia Desimon*

Revisão de texto: *Eduardo Freitas de Souza*

Normalização bibliográfica: *Marilaine Schaun Pelufê*

Editoração eletrônica: *Jaqueline Jardim (estagiária)*

Foto(s) de capa: *Daiane Plácido Torres*

1ª edição

1ª impressão (2015): 30 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Clima Temperado

T693e Torres, Daiane Placido

Estimativa de incerteza de medição em ensaio de contagem de células somáticas por citometria de fluxo em leite bovino cru / Daiane Placido Torres, Ricardo Alexandre Valgas. – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2015.

26 p. (Documentos / Embrapa Clima Temperado, ISSN 1516-8840 ; 401)

1. Análise de laboratório. 2. Controle de qualidade. 3. Normalização. 4. Medição. 5. Leite. I. Valgas, Ricardo Alexandre. II. Título. III. Série.

Autores

Ricardo Alexandre Valgas

Estatístico, M.Sc. em Ciências (Métodos Numéricos em Engenharia), pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

Daiane Placido Torres

Química, D.Sc. em Ciências (Química Analítica), analista da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

Apresentação

A Embrapa Clima Temperado, em consonância com o Sistema Embrapa de Qualidade – SEQ, criado em 2011 pela Diretoria Executiva da Embrapa, busca desenvolver estratégias para apoio à gestão da qualidade e, por consequência, obtenção de eficácia e melhoria contínua nos seus processos de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D). Com a implantação do SEQ, a Embrapa assume, dentre outros, o compromisso de manter-se competitiva e sustentável na geração de conhecimento e tecnologias, adequando-se aos requisitos de normas internacionais e garantindo a excelência de resultados. Entre eles destaca-se a implementação de sistemas de qualidade baseados na Norma ISO 17025 para posterior acreditação de ensaios junto ao Inmetro, com pleno atendimento aos requisitos da referida norma. Nesse sentido, este trabalho aborda uma das etapas mais onerosas do pedido de acreditação de um ensaio na Norma ISO 17025, a estimativa da incerteza referente ao resultado analítico gerado, o que é exigido para a maioria dos ensaios laboratoriais. Tanto a incerteza de medição quanto a tendência são os parâmetros mais importantes de um ensaio, visto que permitem a comparação do resultado obtido experimentalmente com valores de referência, comparações interlaboratoriais, atendimento a requisitos de normas e legislações nacionais e internacionais, entre outros. Portanto, a incerteza de medição permite verificar o atendimento ao critério da Norma de

“adequação ao uso pretendido”. Neste trabalho são apresentadas as etapas da estimativa desse parâmetro para o ensaio de contagem de células somáticas por citometria de fluxo em leite bovino cru.

Clenio Nailto Pillon

Chefe-Geral

Embrapa Clima Temperado

Sumário

Introdução	9
Etapa 1 – Especificar o mensurando	11
Etapa 2 – Identificar as fontes de incerteza	13
Etapa 3 – Quantificar os componentes da incerteza	15
3.1 Uso de Material de Referência (MR)	15
3.2 Curva de calibração com MR.....	16
3.3 Precisão intermediária com amostras-piloto.....	19
Etapa 4 – Cálculo das incertezas padrão, combinadas e expandidas	22
Conclusões	24
Referências	26

Estimativa de Incerteza de Medição em Ensaio de Contagem de Células Somáticas por Citometria de Fluxo em Leite Bovino Cru

Ricardo Alexandre Valgas
Daiane Placido Torres

Introdução

A incerteza é um parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando, segundo o Guia EURACHEM/CITAC (2002). A incerteza da medição está relacionada com muitos componentes, os quais são classificados como componentes do Tipo A e do Tipo B. Alguns desses componentes utilizam os resultados de séries de medições para serem estimados através de sua distribuição estatística, sendo caracterizados por desvios-padrão experimentais. Os demais componentes, os quais também podem ser caracterizados por desvios-padrão, são avaliados por meio de distribuição de probabilidades assumidas com base na experiência ou em outras informações.

Em se tratando de incerteza de medição, não há um processo único para o cálculo, entretanto a obrigatoriedade da sua estimativa para todo ensaio ou calibração é destacado na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005). O item 5.4.6.2 da norma ressalta que uma estimativa rigorosa da incerteza de medição pode ser impedida pela natureza do método, sendo nesses casos suficiente obter uma estimativa razoável da mesma.

A incerteza de medição deve ser relatada juntamente com todo resultado de medição. Um resultado de medição não está completo se faltar alguma expressão de sua incerteza. A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005) preconiza que a incerteza de medição seja avaliada ou que pelo menos seus principais componentes sejam estimados. A incerteza final do resultado de uma medição, obtida de uma combinação das incertezas de múltiplas fontes, é chamada de Incerteza Padrão Combinada, sendo representada pelo símbolo $u_c(y)$. Onde y representa o mensurando, o resultado analítico.

Entre as possíveis abordagens para estimar o cálculo de incerteza, o guia EURACHEM/CITAC pode ser destacado, tendo sido utilizado como base para o cálculo da incerteza de medição no presente trabalho (GUIA EURACHEM/CITAC, 2002). De acordo com as referências supracitadas, o cálculo envolve quatro etapas:

Etapa 1: Especificar o mensurando.

Etapa 2: Identificar as fontes de incerteza.

Etapa 3: Quantificar os componentes da incerteza.

Etapa 4: Calcular a incerteza padrão, combinada e expandida.

Incerteza de medição não implica em dúvida quanto à validade de uma medição; ao contrário, o conhecimento da incerteza implica numa maior confiança na validade do seu resultado (GUIA EURACHEM/CITAC, 2002).

Existem duas metodologias para estimar a incerteza de medição, denominadas de Bottom-Up e Top-Down (BRASIL, 2011). Ambas não apresentam diferenças significativas nos cálculos de incerteza, mas sim no sentido lógico desses cálculos. A metodologia aqui adotada para a estimativa da incerteza de medição de contagem de células somáticas (CCS) em leite bovino cru foi a Top-Down, na qual se

pode usar parâmetros de desempenho do método, como dados de validação intralaboratorial, para a estimativa da incerteza.

Etapa 1 – Especificar o mensurando

Mensurando significa aquilo que está sendo medido, ou seja, o resultado analítico. Para o ensaio de contagem de células somáticas (CCS), o equipamento empregado foi o Somacount 300, da marca Bentley, referente à técnica de citometria de fluxo. O equipamento requer o uso do reagente brometo de etídio para marcar o DNA nas células somáticas. Um pequeno fluxo de fluido transporta as células marcadas através do citômetro de fluxo. Nesse processo, um feixe de radiação emitido por um laser é absorvido pelas células fluorescentes, as quais como consequência emitem radiação em comprimento de onda específico a ser processado pelo equipamento, gerando um sinal analítico que é avaliado como altura de pico.

A equação básica para a quantificação de CCS em leite expressa em contagem de células por microlitro ($CS \mu L^{-1}$) é:

$$CCS_{(CS/\mu L)} = \frac{(A - \beta)}{\alpha} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde,

CCS ($CS/\mu L$) – contagem de células somáticas, em $CS \mu L^{-1}$;

A – altura de pico de CCS na amostra;

β – intercepto da curva de calibração;

α – inclinação da curva de calibração;

Para o cálculo da contagem de células somáticas na amostra, em $CS mL^{-1}$, conforme recomendação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011), emprega-se a Equação (2).

$$CCS(CS \cdot mL^{-1}) = CCS_{CS/\mu L} \times 1000 \quad \text{Equação (2)}$$

A Figura 1 apresenta o fluxograma da metodologia para a contagem de células somáticas em leite bovino, na qual se destacam as etapas 6 e 7, as quais afetam diretamente a incerteza dos resultados obtidos no ensaio.

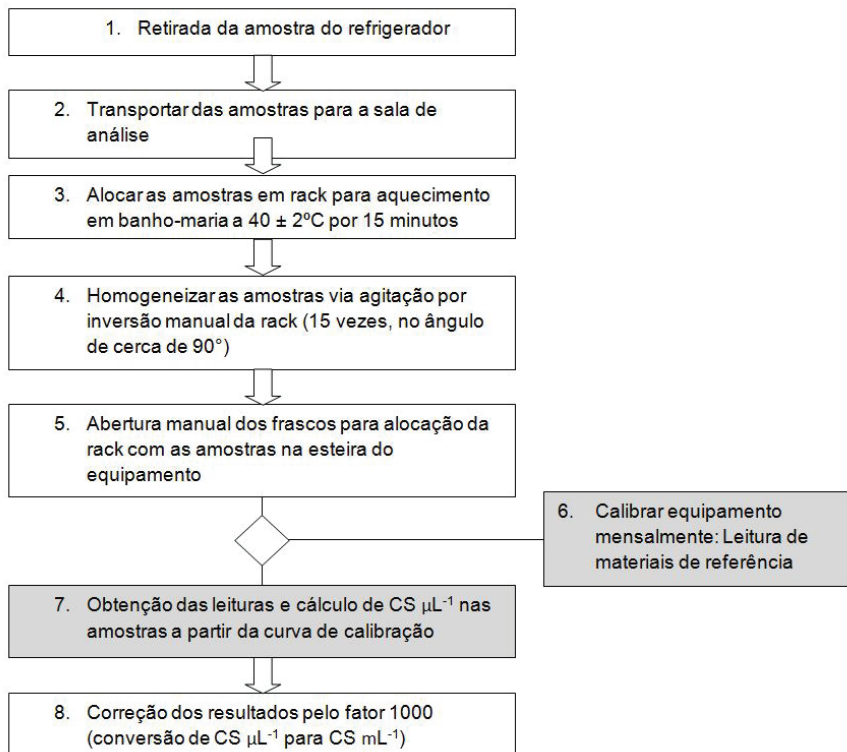


Figura 1. Fluxograma para a metodologia de contagem de células somáticas em leite bovino cru por citometria de fluxo, no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado.

Etapa 2 – Identificar as fontes de incerteza

Para identificar as fontes de incerteza é necessário se embasar na experiência de aplicação da metodologia e suas etapas críticas, as quais foram previamente destacadas na Figura 1. Os dados de desempenho do método (dados de validação) também são de grande importância para essa etapa, sendo destacados por proverem informações suficientes para uma boa estimativa da incerteza (BRASIL, 2011; OLIVARES, 2009).

A metodologia em estudo seguiu a norma internacional ISO 13366-2:2006/ IDF 148-2:2006 (ISO, 2006), referente à enumeração de células somáticas em leite – Parte 2: Guia de operação do contador fluoro-opto-eletrônico.

Com base no fluxograma da metodologia (descrito na Figura 1), uso de material de referência para calibração do equipamento (fornecido pelo Lanagro/MG, com três níveis de CCS – baixo, médio e alto) e dados de um semestre de desempenho do método com amostras-piloto (2º semestre de 2011), preparou-se um diagrama de Ishikawa, apresentado na Figura 2, indicando as principais fontes de incerteza para o ensaio de CCS.

Amostras-piloto, oriundas de rebanho leiteiro da raça Jersey do SISPEL (Sistema de pesquisa e desenvolvimento em pecuária leiteira da Embrapa Clima Temperado), foram utilizadas na avaliação da metodologia a fim de avaliar o desempenho do laboratório, ao longo de um semestre, com sua contribuição de incerteza indicada no diagrama de Ishikawa (Figura 2), para o item reprodutibilidade intralaboratorial. Assim, a dispersão entre os resultados contempla a incerteza relacionada a essa condição de precisão.

A incerteza da curva de calibração (faixa linear de trabalho) pode ser calculada pela regressão linear dos mínimos quadrados (GUIA EURACHEM/CITAC, 2002), o que leva em consideração principalmente

a dispersão de pontos que causam desvios na linearidade. A incerteza relacionada aos materiais de referência para os níveis baixo, médio e alto de CCS foi inserida como uma nova entrada ao diagrama de Ishikawa (Figura 2).

Dessa maneira, a identificação dos principais componentes de incerteza é explicitada na Figura 2, a qual contempla os resultados de avaliação para os parâmetros da curva de calibração, uso de material de referência e reprodutibilidade intralaboratorial (precisão intermediária) com amostras-piloto. Esses parâmetros foram avaliados no segundo semestre de 2011.

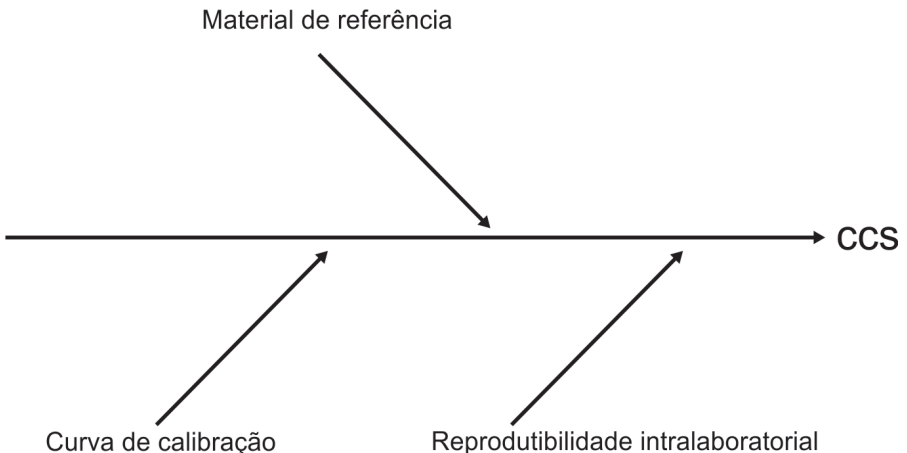


Figura 2. Diagrama de Ishikawa para análise das fontes de incerteza da contagem de células somáticas em leite bovino cru por citometria de fluxo, no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado.

Etapa 3 – Quantificar os componentes da incerteza

A quantificação dos componentes da incerteza no presente estudo baseou-se nos dados obtidos para CCS em leite bovino cru. O objetivo de demonstrá-los de forma detalhada facilita o cálculo da incerteza da metodologia adotada, ISO 13366-2:2006/ IDF 148-2:2006 (ISO, 2006). Os resultados de estimativa de incerteza foram calculados conforme descrito neste trabalho, porém executados diretamente em planilha eletrônica, e apresentados nas tabelas em sequência.

3.1 Uso de Material de Referência (MR)

A medida de materiais de referência constitui efetivamente uma calibração de todo o procedimento de medição contra uma referência rastreável, fornecendo assim excelentes dados para a avaliação da incerteza (GUIA EURACHEM/CITAC, 2002).

Para o ensaio de CCS, a calibração é feita mensalmente pela análise de materiais de referência fornecidos pelo LANAGRO/MG (de baixa, média e alta contagem de CCS). No certificado dos MRs, a incerteza padrão referente a cada MR é informada, assim a incerteza já está no formato padrão para a combinação.

Entretanto, considerando-se os três níveis de contagem de CCS disponíveis a partir dos MRs, é necessário fazer uma estimativa de incerteza padrão que pondere todos os níveis de CCS nos MRs, assim como suas incertezas padrão. Para tanto, a incerteza padrão de cada nível de contagem foi relativizada pelo valor designado de CCS correspondente, e este componente resultante (“Passo 1 da incerteza do MR”) foi então elevado ao quadrado, gerando um outro componente (“Passo 2 da incerteza do MR”) e, ao final, foi calculada a raiz da soma dos componentes do Passo 2. Com base nessas considerações, o valor resultante da incerteza padrão do material de referência foi de 0,08.

Incerteza Padrão do Material de Referência	0,08
--	------

3.2 Curva de calibração com MR

A calibração do equipamento Somacount 300 é feita mensalmente com o emprego de materiais de referência (MRs) com níveis baixo, médio e alto de CCS fornecidos pelo LANAGRO/MG, conforme citado anteriormente. Considerando que um procedimento de calibração está envolvido no processo, foram seguidas as orientações do Guia EURACHEM/CITAC (2002) para a avaliação deste componente como fonte de incerteza. Assim, levaram-se em consideração as seguintes fontes de incerteza para a avaliação da calibração:

1. Variações aleatórias em y: aquelas que afetam as respostas de referência e as respostas medidas.
2. Efeitos aleatórios: aqueles que resultam em erro nos valores designados para x.
3. Valores de x e y: os quais podem estar sujeitos a um deslocamento constante desconhecido.
4. Suposição de linearidade: validade de um modelo linear.
5. Outras fontes: toda e qualquer característica que é capaz de influenciar os resultados.

O Guia EURACHEM/CITAC (2002) destaca que as fontes de número 2, 3, 4 são em geral pouco significativas, e a fonte 5 pode ser abrangida pelo cálculo dos mínimos quadrados da fonte mais significativa (fonte 1), e assim, o cálculo de incerteza pode ser executado considerando a fonte 1, utilizando as Equações (3), das variações aleatórias em y, (4) desvio-padrão (S) e (5), desvio-padrão residual (S_{xx}), apresentadas a seguir.

$$Incerteza = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_x^2}} \quad \text{Equação (3)}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 \cdot c_j)]^2}{n - 2}} \quad \text{Equação (4)}$$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (c_j - \bar{c})^2 \quad \text{Equação (5)}$$

Onde, nas Equações (3), (4) e (5):

B_1 – Coeficiente angular;

p – Número de leituras de cada nível dos MRs;

n – Número total de leituras dos MRs;

C_0 – Média do valor baixo de CCS para os padrões de calibração;

C – Valor médio de CCS nos diferentes padrões de calibração;

A_j – A enésima medição de CCS do enésimo padrão de calibração (onde

$A_j = C_j \times B_1 + B_0$);

C_j – Concentração do enésimo padrão de calibração;

B_0 – Coeficiente linear.

Os dados obtidos experimentalmente, utilizados para construção da curva de calibração, bem como os resultados do desvio-padrão (S), desvio-padrão residual (S_{xx}) e incerteza, são apresentados nas Tabelas 1 e 2, e a curva de calibração na Figura 3.

Para o cálculo de estimativa da incerteza, considerou-se o ponto da curva de calibração referente ao nível baixo de CCS, o qual corresponde a cerca de 139 CS μL^{-1} , tomado como C_0 , uma vez que a incerteza varia em relação a cada ponto da curva. Quanto ao número de medições para determinar CCS (p), considerou-se que $p = 2$, considerando que as leituras dos três níveis de MR são feitas em duplicata.

Tabela 1. Dados de leitura de células somáticas em leite bovino cru por citometria de fluxo utilizados para construção da curva de calibração no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado.

Material de referência	Valores obtidos (CS μL^{-1})*				
	Valor designado (CS μL^{-1})	Incerteza padrão (CS μL^{-1})	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3
Julho					
Poa11mrf0081	149	3	184	173	179
Poa11mrf0082	472	3	575	579	595
Poa11mrf0083	971	1	1194	1198	1184
Agosto					
Poa11mr0102	155	< 1	171	176	173
Poa11mr0103	475	8	512	512	510
Poa11mr0104	916	9	997	983	1002
Outubro					
Poa11mrf0110	112	3	143	153	139
Poa11mrf0111	461	9	492	494	512
Poa11mrf0112	961	30	1012	1032	1037
Novembro					
Poa11mrf0115	129	3	151	161	159
Poa11mrf0116	438	5	498	485	488
Poa11mrf0117	905	1	971	990	1000
Dezembro					
Poa11mrf0137	150	2	183	170	177
Poa11mrf0138	387	11	403	405	372
Poa11mrf0139	900	32	946	910	826

Tabela 2. Informações e resultados do cálculo de incerteza para a curva de calibração.

Informações sobre o cálculo			Resultados		
n	p	C0 (CS μL^{-1})	S	Sxx	Incerteza
15	2	139	3,64	955504,32	2,48 CS μL^{-1}

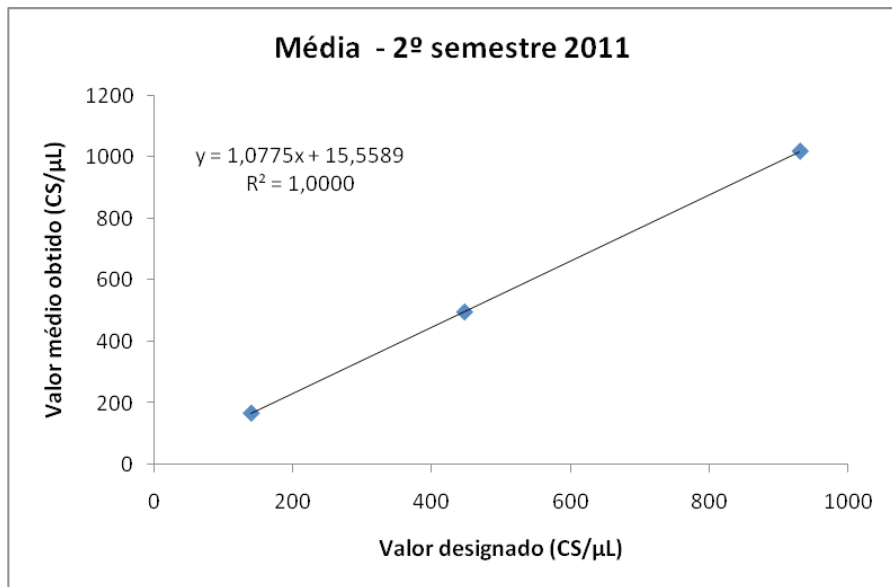


Figura 3: Curva de calibração para o ensaio de contagem de células somáticas em leite bovino cru por citometria de fluxo no Laboratório de Qualidade do Leite da Empresa Clima Temperado.

Com base nas considerações elencadas previamente, o resultado da incerteza para a curva de calibração foi estimado em 2,48 CS μL^{-1} .

3.3 Precisão intermediária com amostras-piloto

A precisão intermediária foi avaliada através do desvio-padrão obtido a partir de dados de controle de qualidade (CQ) com amostras-piloto de leite bovino cru, fornecidas pelo SISPEL, ao longo do segundo semestre de 2011. As amostras-piloto foram classificadas para avaliação do desvio padrão de acordo com a data de preparo da mesma no SISPEL, gerando assim 21 grupos de amostras-piloto. Previamente à análise dos dados de CCS para as amostras-piloto, uma verificação para eliminação de outliers foi executada com o emprego da ferramenta boxplot (MINITAB® Release 14, Statistical Software). Nesse processo, 19 valores de contagem de CCS foram classificados como outliers, os quais não foram considerados para a avaliação da precisão intermediária. No caso de um componente da incerteza ser avaliado

experimentalmente, pela dispersão de medições repetidas, esse pode ser apresentado na forma de um desvio-padrão. Dessa maneira, considerando que os dados de precisão avaliados representam a dispersão de resultados em um longo período de tempo (um semestre), o cálculo da incerteza dessa atividade pode ser expresso diretamente pelo desvio-padrão das medições.

Entretanto, como existe uma variação natural de CCS ao longo do tempo nas amostras-piloto, e as diferentes amostras-piloto foram analisadas número de vezes diferentes (dependendo da disponibilidade de amostra-piloto), há necessidade de se ponderar o cálculo do desvio padrão para tais condições. Desta forma, optou-se pelo cálculo de desvio-padrão combinado para a avaliação da precisão em condições de reprodutibilidade intralaboratorial (precisão intermediária).

Segundo BARROS NETO et al. (2010), a estimativa conjunta do desvio padrão experimental, s_{pool} , de um ensaio repetido n_i vezes, havendo m ensaios diferentes, será dada por:

$$s_{pool} = \sqrt{\frac{v_1 s_1^2 + v_2 s_2^2 + \dots + v_m s_m^2}{v_1 + v_2 + v_m}} \quad \text{Equação (6)}$$

Onde,

s – desvio padrão;

v – é o número de graus de liberdade;

A Tabela 3 apresenta os resultados de CCS obtidos para 21 amostras-piloto analisadas com diferentes números de replicatas. Nesse caso, a incerteza foi calculada a partir da equação (6).

O resultado da incerteza padrão para a avaliação da precisão intermediária, para o qual se obteve um desvio padrão-combinado de 9,47 CS μL^{-1} , foi estimado pelo emprego da Equação (6).

Incerteza Padrão da Reprodutibilidade Intralaboratorial	9,47
--	-------------

Tabela 3. Resultados para avaliação de precisão intermediária com 21 amostras-piloto de leite bovino cru analisadas no segundo semestre de 2011 no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado.

Amostras-piloto				
Data de preparação	Média de CS μL^{-1}	Desvio-Padrão de CS μL^{-1}	Número de análises da amostra	Partes do s_pool
01/08/2011	226,45	6,86	22	989,45
09/08/2011	234,71	8,26	24	1570,96
15/08/2011	343,52	7,51	31	1691,74
22/08/2011	365,38	10,35	13	1285,08
29/08/2011	242,65	5,56	20	586,55
05/09/2011	264,18	8,10	22	1379,27
13/09/2011	363,10	23,85	21	11373,81
19/09/2011	336,18	6,82	11	465,64
26/09/2011	265,93	8,21	29	1885,86
03/10/2011	270,20	9,05	10	737,60
10/10/2011	354,67	11,06	27	3178,00
17/10/2011	256,04	3,97	24	362,96
24/10/2011	289,97	12,22	32	4632,97
31/10/2011	233,67	7,09	18	854,00
16/11/2011	244,33	9,02	12	894,67
21/11/2011	241,81	7,33	27	1398,07
28/11/2011	264,03	5,24	39	1042,97
05/12/2011	400,41	9,12	17	1332,12
12/12/2011	153,03	11,62	37	4860,97
19/12/2011	214,50	5,84	28	921,00
26/12/2011	105,65	4,07	23	365,22
Total geral	263,42	70,17	487	
Soma das partes do s_pool	41808,91 (CS μL^{-1}) ²			
Denominador do s_pool	466			
s_pool	9,47 CS μL^{-1}			

Etapa 4 – Cálculo das incertezas padrão, combinadas e expandidas

A quantificação dos componentes da incerteza e expressão dessas como incerteza padrão está apresentada na Tabela 4. Nessa, as incertezas foram combinadas pela Equação (7), apresentada abaixo, e expandida multiplicando a incerteza combinada por um fator k igual a 2. Com base nesses resultados, essas incertezas foram comparadas na forma gráfica, apresentada na Figura 4.

$$U_c(y) = y \times \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \dots} \quad \text{Equação (7)}$$

Onde,

y – resultado do mensurando;

p e q – parâmetros para o cálculo do mensurando y;

(u(p)/p), etc., – incertezas nos parâmetros, expressas como desvios padrão relativos.

Tabela 4. Resultados das incertezas padrão, combinadas e expandidas para o ensaio de contagem de células somáticas em leite bovino cru por citometria de fluxo.

Amostras-piloto	Valor (x)	Incerteza Padrão u(x)	Incerteza Padrão u(x) percentual	Incerteza Padrão Relativa u(x)/x	Quadrado da Incerteza Padrão Relativa u(x)/x
Material de referência	505,40	0,08	0,02	0,0001515	2,29577E-08
Curva de calibração	139,00	2,84	2,04	0,0204207	0,000417008
Reprodutibilidade Intralaboratorial	263,42	9,47	3,60	0,0359579	0,001292972
Incerteza Combinada				5,75	
Incerteza Combinada percentual				4,14	
Incerteza Combinada percentual				8,27	

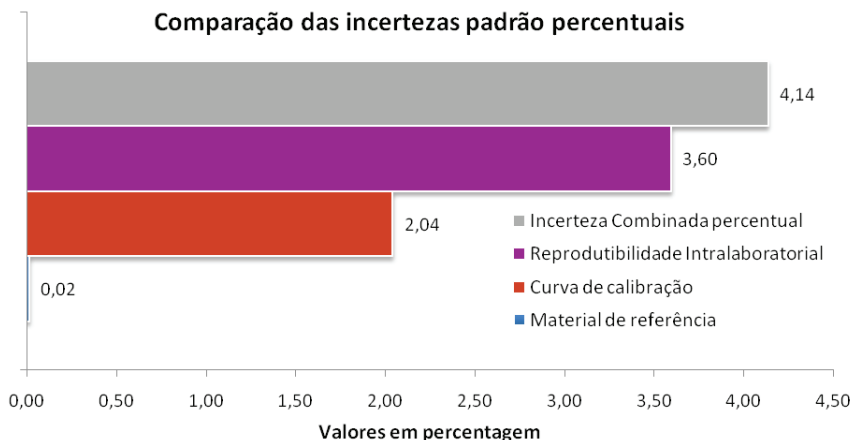


Figura 4. Comparação dos valores das incertezas padrão e combinada para contagem de CCS em leite bovino cru no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado.

A incerteza combinada padrão ou a incerteza expandida do resultado da análise química não deve exceder o limite máximo de incerteza estabelecido por legislação ou norma específica. Na falta desse valor, o critério a seguir deverá ser usado conforme as faixas de precisão para CCS, estabelecidas na Tabela 3 da norma ISO 13366-2 / IDF 148-2 (ISO, 2006), e tendo como base para a estimativa de incerteza dados de precisão intermediária (ou reprodutibilidade intralaboratorial). Neste caso, conforme orientação do Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA (BRASIL, 2011), a incerteza padrão combinada relativa não deve exceder em mais de um terço (1/3) os valores da Tabela 3 e deve ser calculada pela Equação (8):

$$\frac{u_c(c_{\text{anal}})}{c_{\text{anal}}} \leq \left(1 + \frac{1}{3}\right) \times CV_{\text{Tabela 3}} \quad \text{Equação (8)}$$

Onde,

u_c – incerteza padrão combinada;

C_{anal} – concentração do analito na amostra de ensaio analisada;

CV – coeficiente de variação ou desvio padrão relativo;

Uma vez que o desvio-padrão relativo máximo permitido para CCS na Tabela 3 da norma ISO 13366-2 / IDF 148-2 (ISO, 2006), referente à precisão sob condições de reprodutibilidade intralaboratorial, é de 7% para níveis de CCS de até 150.000 células mL⁻¹, o limite máximo de incerteza padrão combinada relativa deve ser 9,33%, conforme Equação (8). Considerando que o valor estimado para a incerteza padrão combinada percentual (ou relativa) foi de 4,02%, pode-se inferir que o ensaio para CCS por citometria de fluxo está em conformidade com o valor máximo de incerteza estabelecido, e a presente abordagem fornece uma estimativa de incerteza de medição sensata e adequada ao uso pretendido.

Conclusões

O cálculo de incerteza de medição descrito para a contagem de células somáticas em leite bovino cru, por citometria de fluxo, foi feito considerando as fontes relacionadas a diferentes etapas do ensaio, incluindo, na estimativa final, as incertezas calculadas a partir de resultados de dados de controle de qualidade do laboratório com amostras-piloto. Os resultados para cada fonte de incerteza, conforme apresentado pelo diagrama de Ishikawa, possibilitaram a comparação da contribuição individual de cada uma das fontes avaliadas.

A estimativa da incerteza de medição (ou incerteza expandida) para o ensaio de CCS foi de 8,27%. Em termos de incerteza padrão combinada relativa, o valor estimado para o ensaio de CCS foi de

4,14%, com base nas considerações do Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA (BRASIL, 2011) e da norma ISO 13366-2 / IDF 148-2 (ISO, 2006). Este valor representa uma estimativa bastante realista das condições de rotina da análise, uma vez que engloba a dispersão de dados para materiais de referência e aquele obtido pelo laboratório. Seguindo as considerações dos documentos supracitados, para o nível de CCS de até 150.000 células mL⁻¹, o limite máximo de incerteza padrão combinada relativa deve ser 9,33%. Dessa forma, pode-se afirmar que os dados de desempenho do laboratório (construção de curva de calibração a partir de MR e precisão intermediária) e análise de material de referência podem oferecer uma estimativa de incerteza adequada. A incerteza relativamente alta para a precisão intermediária se deve basicamente à grande variabilidade da amostra-piloto ao longo do tempo, o que precisa ser levado em consideração já que se trata da forma mais viável para o CQ no laboratório.

Referências

ABNT. ABNT NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2010.

BRASIL. MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). **Manual de garantia da qualidade analítica, resíduos e contaminantes em alimentos**. Brasília, DF, 2011.

GUIA EURACHEM/CITAC: determinando a incerteza na medição analítica. 2. ed. 2002. Disponível em: <<http://allchemy.iq.usp.br/pub/metabolizando/Beta021115.pdf>>. Acesso em: 09 nov. 2014.

ISO 13366-2 / IDF 148-2: Milk – Enumeration of somatic cells – Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. 2nd ed. [Genebra], 2006.

OLIVARES, I. R. B. **Gestão de qualidade em laboratórios**. 2. ed. Campinas: Editora Átomo, 2009.

Anexo

A planilha com os cálculos para a obtenção da incerteza de medição do presente trabalho pode ser fornecida aos interessados via requisição para e-mail dos autores.

Embrapa

Clima Temperado

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA

CGPE 12358