

Anexo I

Catálogo do produto: QF-Coli



QF-COLI

**ANÁLISE VISUAL DE COLIFORMES TOTAIS
E ESCHERICHIA COLI EM ÁGUAS
(Bruta, Tratada, Salobra, Salgada, Efluente,
Mineral e de Balneabilidade)**



quimaflex.com.br

(16) 3461-1691

Benefícios

- ✓ Por ser em pó, oferece uma estabilidade superior aos métodos tradicionais em caldo ou ágar;
- ✓ Resultados obtidos entre 18 e 24 horas;
- ✓ Detecta no mesmo teste Coliformes totais e Escherichia coli;
- ✓ Sensibilidade de 1 UFC / 100 mL;
- ✓ Inibe microrganismos não alvo, tais como: Aeromonas, Enterococcus e Pseudomonas;
- ✓ As análises podem ser realizadas em Tubos ou no sistema Quanti-Tray / 2000¹.

Método ONPG

O reagente ONPG é metabolizado quando em contato com os coliformes, devido a presença da enzima β -galactosidase, resultando em uma coloração amarela.



Método MUG

O reagente MUG é metabolizado quando em contato com a E. coli, devido a presença da enzima β -glucuronidase, resultando em uma fluorescência ao ser exposto a luz UV 366nm.



Presença ou Ausência

O QF-coli deve ser despejado em 100 mL de amostra e a mistura deve ser agitada suavemente até ficar homogênea. Então deve-se incubar em uma estufa a 35°C por um período entre 18h e 24h.



Coliformes totais



Escherichia coli



Quantitativo

O QF-coli deve ser despejado em 100 mL de amostra e a mistura deve ser agitada suavemente até ficar homogênea. Em seguida a amostra deve ser despejada no Quanti-Tray / 2000¹. Então a placa deve ser selada e incubada em uma estufa a 35°C por um período entre 18h e 24h. Os resultados devem ser lidos conforme tabela apropriada.



Coliformes totais



Escherichia coli



Anexo II

Estudo de conduzido pelo Laboratório Suprema Tecnologia Analítica Ltda, Certificado de Acreditação n° CRL 1546, entitulado: Coliformes totais e Escherichia coli – Determinação Quantitativa pela Técnica de Multiplos Poços (Quanti-Tray/2000) – NMP (Substrato Enzimatico) SMWW 23a Edição, 2017, Método 9223B 4.c

Coliformes totais e Escherichia coli – Determinação
Quantitativa pela Técnica de Múltiplos Poços
(Quanti-Tray/2000) – NMP (Substrato Enzimático)

SMWW 23ª Edição, 2017, Método 9223B 4.c

ST ANALÍTICA
Análises Químicas

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	2
2.	TÍTULO.....	2
3.	ADVERTÊNCIAS.....	2
4.	ESCOPO	2
5.	DEFINIÇÕES.....	3
6.	PRÍNCIPIO DO MÉTODO	4
7.	REAÇÕES.....	4
8.	REAGENTES E MATERIAS.....	5
9.	EQUIPAMENTOS.....	5
10.	AMOSTRAGEM.....	5
11.	PROCEDIMENTO	5
12.	CÁLCULOS	8
13.	DADOS ESTATÍSTICOS.....	10
14.	QUALIDADE ASSEGURADA E CONTROLE DE QUALIDADE	15
15.	RESULTADO DOS TESTES	19
16.	ANEXOS.....	19
17.	BIBLIOGRAFIA.....	20
18.	PLANO DE TRABALHO	20

1. INTRODUÇÃO

Os testes de substrato enzimático usam substratos cromogênicos e fluorogênicos hidrolisáveis para detectar simultaneamente enzimas produzidas por coliformes totais e *Escherichia coli* (*E. coli*). Nesse método, as bactérias coliformes totais produzem a enzima β -d-galactosidase, que cliva o substrato cromogênico no meio para liberar o cromogênio. A maioria das cepas de *E. coli* produz a enzima β -glucuronidase, que cliva um substrato fluorogênico no meio para liberar fluorogênio. A liberação de cromogênio indica que bactérias coliformes estão presentes, e a liberação de fluorogênio indica que *E. coli* está presente.

Os formatos de tubos múltiplos, poços múltiplos ou presença / ausência (amostra única de 100 mL) estão disponíveis para uso com esses testes de substrato de enzima.

Esses testes de coliformes de substrato enzimático são recomendados para a análise de amostras de água potável, água de fonte, água subterrânea e água residual. Se um laboratório não tiver usado este método antes, é desejável conduzir testes paralelos (incluindo variações sazonais) com o método existente para avaliar a eficácia específica do local e comparar os resultados. Os resultados de muitos estudos de desempenho de métodos estão disponíveis na literatura e as taxas de resultados falso-positivos e negativos diferem entre as várias mídias. Os usuários devem selecionar cuidadosamente o meio e o procedimento que melhor atende às suas necessidades.

As amostras de água contendo húmico ou outro material podem ser coloridas. Se houver uma cor de fundo natural, observe qual é. Se a água for amarelada o suficiente para ser mal interpretada como um positivo fraco após a incubação, use um meio que não fique amarelo. O alto teor de sal de cálcio em algumas águas pode causar precipitação, mas isso não deve afetar a reação.

O método foi validado conforme sessão 9020B.11 para obter orientação sobre como validar novos métodos utilizando o substrato enzimático ONPG-MUG da marca QF-Coli da empresa Quimaflex Científica

2. TÍTULO

Coliformes totais e *Escherichia coli* - Determinação quantitativa pela técnica de múltiplos poços - NMP (Substrato Enzimático).

3. ADVERTÊNCIAS

Utilizar os devidos EPI's durante o preparo de reagentes e soluções, bem como durante a utilização de solventes no preparo de amostras (Luva nitrílica, jaleco branco, máscara para gases, óculos de segurança).

4. ESCOPO

A água potável não deve conter micro-organismos patogênicos e deve estar livre de bactérias indicadoras de contaminação fecal, por isso o controle desses microorganismos é essencial para a saúde humana. A análise microbiológica da água fornece subsídio a respeito da sua portabilidade, isto é, ausência de risco de ingestão de micro-organismos causadores de doenças. Como indicadores de contaminação fecal, são eleitas como bactérias de referência as do grupo coliforme. O principal representante desse grupo de bactérias chama-se *Escherichia coli*.

É fundamental o fornecimento de água de boa qualidade para atender às necessidades básicas da população e permitir um ótimo padrão de vida. Para garantir sua portabilidade é importante que a água seja verificada, analisando a ausência de coliformes totais e *E. coli*.



FORMULÁRIO

Código FO 184

Aprovada em 02/03/2020

Título

PLANO DE VALIDAÇÃO E VERIFICAÇÃO DE MÉTODOS

Revisão
02

Página
3/21

O método quantitativo estudado pela cartela de múltiplos poços Quanti Tray 2000 possui faixa de trabalho é de <1 a >2419.6 MPN/100 mL conforme a IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table (per 100mL)

5. DEFINIÇÕES

Limite de Detecção: São menores valores de concentração do analito ou de uma propriedade que pode ser detectado pelo método. É determinado por uma análise completa de uma dada matriz contendo analito.

Limite de Quantificação: É a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível de exatidão e precisão. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão.

Linearidade: É a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração do analito. A linearidade é obtida através da padronização interna ou externa e formulada com expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinada na amostra real. Cabe avaliar a homocedasticidade (homogeneidade de variáveis).

Faixa de Trabalho e Faixa Linear: Todo método quantitativo, há uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. Dentro da faixa de trabalho pode haver uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A faixa linear é o intervalo entre os níveis superior e inferior de concentração do analito que foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e a linearidade exigidas, sob condições específicas para o ensaio. A faixa linear é normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtido pelo método analítico.

Recuperação e Tendência: Recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (*Spike*). As amostras podem ser misturadas com o analito em pelo menos 3 concentrações diferentes.

Tendência: A tendência pode ser expressa como recuperação analítica, definida como: Valor observado/ valor esperado. É importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos.

Repetibilidade: É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo avaliado, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetibilidade, seguindo: os mesmos procedimentos da medição, observador, instrumento usado sob as mesmas condições, local e repetições em curto espaço de tempo. A repetibilidade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados, podendo ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição a um branco em várias concentrações na faixa de trabalho. Recomenda-se

7 ou mais repetições para cálculos do desvio padrão para cada concentração proposta, chamado de desvio padrão de repetitividade.

Reprodutibilidade ou Precisão Intermediária: Denominada também de reprodutibilidade interna, referindo-se a precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo local, mas definindo exatamente quais condições a variar, sendo uma ou mais, tais como: diferentes equipamentos, com diferentes analistas em diferentes tempos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais recomendável a usar. Desta forma, são efetuadas “n” medições em replicata, ou em único ensaio, sobre a amostra, nas condições pré-definidas, pois existem vários métodos de estudar este tipo de precisão. Em alguns casos, o valor da precisão intermediária é função do nível de concentração do ensaio e seu cálculo é efetuado, preferivelmente, a partir dos resultados obtidos, após eliminação dos resultados dispersos.

Seletividade: Especificidade ou Seletividade é a habilidade de avaliar inequivocadamente o analito na presença de componentes que se esperam estar presentes. Tipicamente, estes componentes podem incluir diluentes, impurezas, degradados e componentes da matriz.

Robustez: A robustez é definida como a indicação da capacidade de um método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos

6. PRÍNCIPIO DO MÉTODO

Os meios de cultura contêm nutrientes indicadores que, hidrolisados pelas enzimas específicas dos coliformes provocam uma mudança de cor no meio.

Estes testes enzimáticos usam cromogênicos hidrolizáveis e substratos fluorogênicos para detectar simultaneamente enzimas produzidas por coliformes totais e *Escherichia coli* (*E. coli*). Nesse método, bactérias coliformes totais produzem a enzima - β -galactosidase, que cliva o substrato cromogênico no meio para liberar cromógeno. A maioria das cepas de *E. coli* produzem a enzima -glucuronidase, que cliva um substrato fluorogênico no meio para libertar fluorogênio. A liberação do cromógeno indica que as bactérias coliformes estão presentes, e a liberação de fluorógeno indica que *E. coli* estão presentes.

O método é aplicável para as técnicas de Múltiplos tubos, múltiplos poços ou presença-ausência (em 100-ml).

7. REAÇÕES

A enzima D-galactosidase é detectada por meio de substratos cromogênicos (ONPG) que quando adicionado na amostra, é homogeneizado e incubado a uma temperatura de $35,0 \pm 0,5$ ° por 24h. Após o período de incubação, se amarelo é observada, coliformes totais estão presentes.

A detecção da enzima B glucoronidase é por meio do substrato fluorogênico (MUG), que quando hidrolisa o substrato fluorogênico produz uma fluorescência azulada, vista pela luz UV (365 nm), indicando a presença de E. Coli, quando incubada nas mesmas condições do substrato cromogênicos.

8. REAGENTES E MATERIAS

Nome	Código	Validade	Certificado	Incerteza
K. pneumoniae ATCC13883 – Lot: 351-74-5	1322-37593/2022	31/05/2023	351-74-5	N/A
Escherichia coli ATCC25922 – Lot: 335-534-2	295-37593/2022	31/08/2023	335-534-2	N/A
P. aeruginosas ATCC27853 – Lot: 353-474-4	296-37593/2022	30/04/2023	353-474-4	N/A
QF-Coli Quimaflex Cientifica Lot: 220117073	3548-36497/2022	18/01/2023	220117073	N/A
Colilert Idexx Lot: HT52B	3548-36502/2022	12/11/2022	HT52B	N/A
Frasco Estéril com Tiosulfato de Sódio 1mg	4363-36497/2022	23/04/2023	20210423	N/A

9. EQUIPAMENTOS

Nome	Código	Certificado	Incerteza
Estufa Bacteriológica	AB-EQ-148	E43334A/19	± 0,2 °C
Micropipeta 1 à 10 mL	AB-EQ-163	EVV-12072-01/2019	± 0,014 mL
Micropipeta 100 à 1000 uL	AB-EQ-463	EVV-10287-08RV01/2018	± 0,82 uL
Micropipeta 10 à 100 uL	AB-EQ-553	E23289/19	± 0,050 uL

10. AMOSTRAGEM

As amostras deverão ser coletadas em frascos ou bolsas estéreis com preservação química tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), transportadas sob refrigeração e armazenadas ≤ 10 °C.

11. PROCEDIMENTO

Este procedimento é baseado nas técnicas disponíveis no SMWW 23ª Edição, 2017 na sessão 9223 B. Enzyme Substrat Test. As soluções, meios e caldos preparados, bem como todos os itens de ensaio devem ser registrados no FO 186 – Controle de itens de Ensaio – Biologia.

Os testes realizados neste procedimento de validação visam assegurar a equivalência do produto referenciado no SMWW 23ª Edição, 2017 e o produto QF-Coli do fabricante Quimaflex Cientifica.

As quantidades dos testes foram estabelecidas conforme previstos no DOQ-CGCRE-008 ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS Revisão 09 – JUN/2020.

A Tabela 8 (DOQ-CGCRE-008_Rev 09) apresenta um resumo da determinação da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

a) Mesmo analista, equipamento, laboratório, período curto (repetibilidade): Testes ≥ 6

Determinar o desvio padrão amostral da repetibilidade de cada concentração.

b) Analistas e equipamentos diferentes, mesmo laboratório, período estendido (precisão intermediária): Testes ≥ 6

Determinar o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial de cada concentração.

Todas as etapas do procedimento de ensaio deveram ser executadas utilizando técnicas assépticas em capela de fluxo laminar.

Os reagentes devem ser levados para temperatura ambiente, 20 a 28 ° C antes do uso.

Para realização dos ensaios de LD-LQ, repetibilidade, precisão intermediária, as amostras foram contaminadas com cepa Klebsiella pneumoniae ATCC13883, Escherichia coli ATCC25922 e Pseudomonas aeruginosa ATCC27853 e assepticamente distribuídas em frascos estéreis conforme tabela abaixo:

Amostras Contaminadas: Cepa Klebsiella pneumoniae ATCC13883 – Lot: 351-74-5 Val. 31/05/2023		
Parâmetro de Validação	QF-Coli	Colilert
LD-LQ	7	7

Amostras Contaminadas: Cepa Escherichia coli ATCC25922 – Lot: 335-534-2 Val.31/08/2023		
Parâmetro de Validação	QF-Coli	Colilert
LD-LQ	7	7

Amostras Contaminadas: Cepa Klebsiella pneumoniae ATCC13883 – Lot: 351-74-5 Val. 31/05/2023		
Parâmetro de Validação	QF-Coli	Colilert
Repetibilidade	6	0
Precisão Intermediária	0	6

Amostras Contaminadas: Cepa Escherichia coli ATCC25922 – Lot: 335-534-2 Val.31/08/2023

Parâmetro de Validação	QF-Coli	Colilert
Repetibilidade	6	0
Precisão Intermediária	0	6

Amostras Contaminadas: Cepa Pseudomonas aeruginosas ATCC27853 – Lot: 353-474-4 Val. 30/04/2023

Parâmetro de Validação	QF-Coli	Colilert
Repetibilidade	6	0
Precisão Intermediária	0	6

Preparo das Amostras Contaminadas

- Para o teste **negativo** para Coliformes totais e Escherichia coli, proceder a análise com água estéril contaminadas com cepa de Pseudomonas aeruginosas ATCC27853, preparar o material para teste conforme descreve o procedimento para uso e manutenção das cepas (IT-092). Será adicionado 10 µl da cepa referência em 100 ml de água estéril.
- Para o teste **positivo** para Coliformes totais e **negativo** para Escherichia coli proceder a análise com água estéril contaminadas com cepa Klebsiella pneumoniae ATCC13883, preparar o material para teste conforme descreve o procedimento para uso e manutenção das cepas (IT-092). Será adicionado 10 µl da cepa referência em 100 ml de água estéril.
- Para o teste **positivo** para Coliformes totais e **positivo** para Escherichia coli proceder a análise com água estéril contaminadas com cepa Escherichia coli ATCC25922, preparar o material para teste conforme descreve o procedimento para uso e manutenção das cepas (IT-092). Será adicionado 10 µl da cepa referência em 100 ml de água estéril.

Preparo do local para execução dos Ensaios

- Retirar as amostras do refrigerador 30 minutos (aproximadamente) antes da execução do ensaio.
- Antes de iniciar o ensaio, o analista deve ligar o fluxo de ar acionando o botão operação por 20 a 30 minutos (o fluxo de ar deve ser desligado somente após a limpeza de finalização do ensaio). Em paralelo realizar a limpeza da bancada do local de trabalho e da capela de fluxo laminar com a utilização de luva.
- A limpeza é realizada com papel umedecido com Álcool 70%, e deve ser passado sobre as bancadas e a capela de fluxo laminar em uma única direção.

Execução do procedimento: SMWW 23ª Edição, 2017, Método 9223B 4.c

Procedimento multi-poços: Este procedimento é realizado com bandejas multi-poços descartáveis esterilizadas Quanti-Tray/2000

- Adicionar assepticamente o meio de cultura (QF-Coli/ Colilert) para uma amostra de água previamente preparada de 100 ml e agitar vigorosamente para dissolver.
- Para abrir o Quanti-Tray, use uma mão para segurar a unidade na vertical (com o lado do poço voltado para a palma) e aperte a parte superior da bandeja de modo que ela se dobre em direção a palma. Puxe suavemente a aba da folha para separar a folha da bandeja, tomando cuidado para não tocar no interior do papel alumínio ou da bandeja.
- Adicionar a mistura de amostra de água e meio de cultura diretamente na bandeja, evitando o contato com aba de folha. Bata suavemente nos poços pequenos (Quanti-Tray 2000) 2 a 3 vezes para liberar quaisquer bolhas de ar que possam estar presas. Esperar a espuma assentar, embora seja aceitável alguma espuma.
- Coloque a bandeja na inserção de borracha apropriada com o lado do poço (plástico) voltado para baixo e sele-a no selador Quanti-Tray.
- O selante dispersa a amostra nos poços e sela a embalagem.
- Incubar por 24 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida fazer a leitura/comparação visual da coloração dos tubos conforme *IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table (per 100ml)*
- Os poços grandes deveram ser lidos verticalmente, enquanto os menores horizontalmente.

12. CÁLCULOS

A linearidade foi avaliada pela construção de uma curva de calibração com 5 pontos em triplicata. Foi avaliada a correlação entre os resultados obtidos pelo coeficiente de correlação R^2 . A homoscedade dos resultados foi avaliada pelo teste de Cochran, sendo :

$$C = \frac{S_{Max}^2}{\sum S^2}$$

Onde S_{Max}^2 é a maior variância entre as réplicas e $\sum S^2$ é o somatório de todas as variâncias. O valor obtido é comparado com um valor tabelado $C_{tab} = 0,6838$.

A existência de valores aberrantes foi avaliada pelo teste de Grubbs, sendo:

$$G_{sup} = \frac{(y_{m\acute{a}x} - \bar{y})}{s}$$

$$G_{inf} = \frac{(y_{m\acute{i}n} - y)}{s}$$

Onde $y_{m\acute{a}x}$ e $y_{m\acute{i}n}$ são, respectivamente, o maior e menor valor da média das triplicatas das respostas; \bar{y} é o valor médio das triplicatas das respostas, e s é o desvio padrão das médias das triplicatas das respostas. Os valores obtidos são comparados com um valor tabelado $G_{crit} = 1,71$.

O LD foi determinado pela estimativa do desvio padrão do branco de amostra fortificado na menor concentração aceitável do analito, pela equação:

$$LD = 3,143 * s$$

Onde s é o desvio padrão de 7 leituras consecutivas do branco fortificado.

O LQ foi determinado pela estimativa do desvio padrão do branco de amostra fortificado na menor concentração aceitável do analito, pela equação:

$$LQ = 10 * s$$

Onde s é o desvio padrão de 7 leituras consecutivas do branco fortificado.

A recuperação foi estimada pela leitura de uma matriz fortificada (água tratada) em 3 níveis de concentração, em 10 réplicas independentes num período de 5 dias, sendo 2 réplicas por dia. Foram avaliados os percentuais de recuperação (Fator de Recuperação) e os coeficientes de variação das 10 réplicas por nível pelas equações:

$$F_{rec} = \frac{100 * (A - AF)}{Vr}$$

Onde: F_{rec} é o fator de recuperação; A é o valor da leitura da amostra (ou branco); AF é o valor da leitura da amostra fortificada (ou branco fortificado); Vr é o valor da fortificação.

$$C.V. \% = \frac{100 * s}{M_{Frec}}$$

Onde: $C.V. \%$ é o coeficiente de variação; s é o desvio padrão das 10 réplicas por nível; M_{Frec} é o valor médio dos fatores de recuperação obtidos.

A Tendência foi avaliada pelo padrão de distribuição dos resultados em um gráfico contendo limites de advertência e limites críticos, durante o período de estudo. Os limites foram calculados pelas equações:

Limite de Advertência:

$$LA = M_{Frec} \pm 2 * s$$

Limite Crítico:

$$LC = M_{Frec} \pm 3 * s$$

A repetibilidade foi avaliada pela medição de padrões 3 níveis de concentração avaliado em 7 réplicas independentes no mesmo dia. Foi avaliado o coeficiente de variação entre as réplicas.

A precisão foi avaliada pela medição de padrões 3 níveis de concentração avaliado em 7 réplicas independentes, por um analista diferente. Foi avaliado o coeficiente de variação entre as réplicas.

13. DADOS ESTATÍSTICOS

Os dados obtidos no procedimento de ensaio devem ser registrados no FO 074 Relatório de Validação de Método Analítico para avaliar se o desvio padrão experimental da reprodutibilidade está compatível com o desvio padrão predito pela equação de Horwitz, modificada por Thompson, que é baseada na concentração c do analito:

A partir do desvio padrão s é útil calcular os limites de precisão. Isso permitirá ao analista decidir quando há uma diferença significativa, a um determinado nível de confiança, entre os resultados de análises duplicadas de uma amostra obtida sob condições especificadas. O limite de repetibilidade (r) é calculado conforme a equação:

$$r = t_{(n-1,1\alpha)} 2. sr$$

Onde o fator 2 reflete a diferença entre 2 medições, t é o valor da abscissa da distribuição t (Student) bilateral para determinado número de graus de liberdade (relacionados à estimativa do sr) e nível de confiança. Para graus de liberdade relativamente altos, t é aproximadamente igual a 2 para 95,35% de confiança; assim, o limite de repetibilidade é frequentemente aproximado como:

$$r = 2,8. sr$$

Seletividade é o grau em que o método pode quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente (AOAC, 2002). Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo.

Teste estatístico: Teste F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias, por nível de concentração e Teste t (Student) de comparação de médias, por nível de concentração.

Repetitividade

Legenda:

Resultados

Entrada de dados

Data da execução:

25/03/2022

			Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.	C.V.	
Nível 1	Amanda K. P. Zago	25/03/2022	Klebsiela. pneumoniae ATCC13883 + QF-Coli	1	30,50000	29,64	0,802	2,71%
				2	29,00000			
				3	30,50000			
				4	29,00000			
				5	29,00000			
				6	30,50000			
				7	29,00000			
Nível 2	Amanda K. P. Zago	25/03/2022	Escherichia coli ATCC25922 + QF-Coli	1	56,10000	54,67	1,336	2,44%
				2	53,60000			
				3	56,10000			
				4	56,10000			
				5	53,60000			
				6	53,60000			
				7	53,60000			
Nível 3	Amanda K. P. Zago	25/03/2022	Pseudomonas aeruginosas ATCC27853 + QF-Coli	1	0,00000	0,00	0,000	#DIV/0!
				2	0,00000			
				3	0,00000			
				4	0,00000			
				5	0,00000			
				6	0,00000			
				7	0,00000			

Limite de repetitividade Nível 1		Limite de repetitividade Nível 2		Limite de repetitividade Nível 3	
t_{tab} (95%)	1,94	t_{tab} (95%)	1,94	t_{tab} (95%)	1,94
n	7	n	7	n	7
s	0,80200	s	1,33600	s	0,00000
r	2,20035	r	3,66542	r	0,00000

Conclusão:

Critério de aceitação para CV ≤ 20% para medidas de propriedade.

Reprodutibilidade/ Precisão Intermediária

Legenda:

Resultados

Entrada de dados

Nível 1	1,00		Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.	Variância
	Operator:	25/03/2022					
Operator: Maria Julia Mieli	Klebsiela. pneumoniae ATCC13883 + Colliet - Idexx	1	29,0000	29,36	1,046	1,093406593	
		2	27,5000				
		3	27,5000				
		4	29,0000				
		5	30,5000				
		6	29,5000				
		7	30,5000				
Operator: Amanda K. P. Zago	25/03/2022	1	30,5000	29,36	1,046	1,093406593	
		2	29,0000				
		3	30,5000				
		4	29,0000				
		5	29,0000				
		6	30,5000				
		7	29,0000				

Limite de reprodutibilidade Nível 1	
t _{tab} (95%)	1,94
n	7
S _R	1,046
R	2,86978
DPR _r = C.V.	3,56%

DPR _r (teórico)	2,000
HORRAT	0,017813

$$DPR_r = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Conclusão:

 Critério de aceitação para $CV \leq 20\%$.

 Valor de HORRAT ≤ 2 , os valores da reprodutibilidade do método são satisfatórios.

Reprodutibilidade/ Precisão Intermediária

Legenda:

Resultados

Entrada de dados

		1,00	Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.	Variância
		1,00					
Nível 2	Operador: Maria Julia Mieli	Escherichia coli ATCC25922 + Colilert - Idexx	1	51,2000	53,98	1,892	3,578736264
			2	51,2000			
			3	53,6000			
			4	56,1000			
			5	56,1000			
			6	53,6000			
			7	51,2000			
	Operador: Amanda K. P. Zago	25/03/2022	1	56,1000			
			2	53,6000			
			3	56,1000			
			4	56,1000			
			5	53,6000			
			6	53,6000			
			7	53,6000			

Limite de reprodutibilidade
Nível 2

$t_{tab} (95\%)$	1,94
n	7
S_R	1,892
R	5,19084
DPR_r = C.V.	3,51%

DPR_r(teórico)

2,000

HORRAT

0,017525

$$DPR_r = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Conclusão:

Critério de aceitação para CV ≤ 20%.

Valor de HORRAT ≤ 2, os valores da reprodutibilidade do método são satisfatórios.

Reprodutibilidade

Legenda:
Resultados
Entrada de dados

		1,00	Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.	Variância
		1,00					
Nível 3	Operator: Maria Julia Mieli	Pseudomonas aeruginosas ATCC27853 + Colilert - Idexx	1	0,0000	0,00	0,000	0,000000000
			2	0,0000			
			3	0,0000			
			4	0,0000			
			5	0,0000			
			6	0,0000			
			7	0,0000			
	Operator: Amanda K. P. Zago	25/03/2022	1	0,0000			
			2	0,0000			
			3	0,0000			
			4	0,0000			
			5	0,0000			
			6	0,0000			
			7	0,0000			

Limite de reprodutibilidade Nível 3	
t _{tab} (95%)	1,94
n	7
S _R	0,000
R	0,00000
DPR _r = C.V.	#DIV/0!

DPR _r (teórico)	2,000	$DPR_r = 2^{(1-0,5 \log C)}$
HORRAT	#DIV/0!	

Conclusão:

Critério de aceitação para $CV \leq 20\%$.

Valor de HORRAT ≤ 2 , os valores da reprodutibilidade do método são satisfatórios

14. QUALIDADE ASSEGURADA E CONTROLE DE QUALIDADE

Os controles de qualidades aplicáveis ao procedimento estão descritos no *PSGQ 007 – Garantia da Qualidade dos Resultados* conforme descreve SMWW 23ª Edição, 2017, Método sessão 9020 tabela 9020:1 Key Quality Control Practices.

Comparador de Cor

- Comparador fluorescente para *Coliformes Totais/ Escherichia coli*. O resultado deve ser igual a tabela de interpretação abaixo:

Aparência	Resultado
Menos amarelo que o comparador	Negativo para Coliformes totais e <i>E. coli</i>
Amarelo igual ou superior ao comparador	Positivo para Coliformes totais
Amarelo e fluorescência igual ou superior ao comparador	Positivo para <i>E. coli</i>

Meio de Cultura – Substrato Cromogênico/Fluorogênico

- A cada novo lote, realizar o controle de positivo e negativo do teste de funcionalidade
- Para o teste **negativo** para Coliformes totais e *Escherichia coli*, proceder a análise com água estéril contaminadas com cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, preparar o material para teste conforme descreve o procedimento para uso e manutenção das cepas (IT-092).
- Para o teste **positivo** para Coliformes totais e **negativo** para *Escherichia coli* proceder a análise com água estéril contaminadas com cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883, preparar o material para teste conforme descreve o procedimento para uso e manutenção das cepas (IT-092).
- Para o teste **positivo** para Coliformes totais e **positivo** para *Escherichia coli* proceder a análise com água estéril contaminadas com cepa *Escherichia coli* ATCC25922, preparar o material para teste conforme descreve o procedimento para uso e manutenção das cepas (IT-092).
- Caso houver divergência nos resultados, repetir o processo. Se persistir, o lote de substrato deverá ser substituído.
- Registrar os controles realizados no FO- 186 Controle de uso dos itens de ensaio Biologia, na aba teste de funcionalidade.

Controle de Asséptico – Fluxo Laminar

- **Fluxo de Ar**
- Verificar semanalmente se o fluxo de ar está funcionando corretamente.
- Erguer o vidro da capela de fluxo laminar e colocar o umidificador dentro da capela, ligá-lo conforme a IT-112 Umidificador ultrassônico.

- Baixar o vidro da capela de fluxo laminar e ligar o fluxo de ar.
- Verificar se o fluxo de ar da capela irá sugar o vapor do umidificador ultrassônico.
- Registrar no FO 156 – Verificação do Fluxo de Ar.

Luz Germicida

- Realizar o monitoramento do ar mensalmente com as placas TSA e SDA e, da(s) superfície (s) a cada uso com a placa TSA Rodac, para averiguar e monitorar a eficiência da Luz U.V na assepsia do ambiente, conforme a IT – 088.
- Fazer o preparo do local de trabalho, em seguida realizar a desinfecção.
- Registrar no FO 106 – Verificação das condições assépticas do Laboratório.

Frasco de Coleta

A cada novo lote, realizar o controle de esterilidade do frasco com caldo nutritivo e a eficácia de eliminação cloro residual livre.

Caldo Nutritivo de Lactose

Pesar $3,25 \pm 0,05$ g do caldo de lactose e dissolver em 250 ml de água purificada. Transferir para um frasco reagente e autoclavar a meia rosca a 121 °C por 15 minutos. Registrar os controles realizados FO-186 no Controle de Uso de Itens de Ensaio Biologia, na aba: Preparo de Soluções e Cepas.

- Preparar o caldo a cada uso.

Teste de Esterilidade do Frasco

- Preparar o local de trabalho.
- Abrir o frasco microbiológico e rapidamente adicionar 100 ml do Caldo Nutritivo de Lactose.
- Incubar o frasco em estufa bacteriológica a $35 \pm 0,5$ °C por 24 horas.
- Ao término, repetir a limpeza da capela de fluxo laminar com papel umedecido com álcool 70% e desligar o fluxo de ar.
- Após o tempo de incubação realizar o teste de fluorescência e o teste visual, garantindo que o caldo incubado no frasco não apresente nenhuma mudança em suas características físicas, como material em suspensão, turvação ou algo similar.
- Registrar os controles realizados FO-186 no Controle de Uso de Itens de Ensaio Biologia, nas abas: Teste de Funcionalidade e Controle de Qualidade.

Teste de Eliminação do Cloro

- Preparar o local de trabalho.
- Abrir o frasco microbiológico e rapidamente adicionar 100 ml de água da torneira.
- Seguir conforme IT 047 Determinação de Cloro Residual Livre Com N,N-DIETIL-P-FENILENOTETRAMINA (DPD).

Teste de Volume

- Preparar o local de trabalho.

- Preencher uma proveta de 100 mL calibrada com água e ver no frasco microbiológico observando se atinge a marcação de volume.
- Caso o lote apresente desvio significativo, despresar e substituir por um novo lote.
- Registrar os controles realizados FO-186 no Controle de Uso de Itens de Ensaio Biologia, nas abas: Teste de Funcionalidade e Controle de Qualidade.

Estufa Bacteriológica

- Realizar o monitoramento da temperatura da estufa diariamente nos períodos de análise. Realizar a leitura da temperatura na parte da manhã e da tarde
- Registrar no FO 040 – Registro de Inspeção da Temperatura da Estufa

Monitoramento da Água Reagente

Monitoramento da qualidade da água reagente conforme Tabela 9020:II Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

Para execução dos ensaios abaixo, seguir conforme os procedimentos vigentes no laboratório e reportar os resultados nesse formulário atentando-se a periodicidade de cada ensaio.

Condutividade	IT 025 – Determinação da Condutividade Eletrolítica
Metais pesados*	IT 097 – Determinação de Metais Totais e Metais Dissolvidos por Espectrometria de
Metais Totais	Emissão Plasma Óptico Indutivamente Acoplado (ICP-OES)
Cloro Residual Livre	IT 047 – Determinação Residual Livre com N, N Dietil – P – Fenilenotetramina (DPD)
Bactérias Heterotróficas	IT 016 – Determinação de Bactérias Heterotróficas Pour Plate
Carbono Orgânico	IT 158 – Determinação de Carbono Orgânico Total

TESTES QUÍMICOS

Teste	Data	Frequência	Método	Resultado	Limite Máximo	Responsável
Condutividade		Diário	SMWW 2510B		< 2 µS/ cm	
Carbono Orgânico		Mensal	EPA 9060A:2004		< 1,0 mg/L	
Metais pesados*		Anual**	EPA 6010D:2018		< 0,05 mg/L	
Metais Totais		Anual**	EPA 6010D:2018		< 0,10 mg/L	
Cloro Residual Livre		Diário	SMWW 4500Cl – G		< 0,10 mg/L	

* Metais pesados (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn)

** Deverá ser avaliado criticamente ao longo do ano, caso ocorra algum problema deve-se estabelecer um monitoramento com maior frequência.

TESTES MICROBIOLÓGICOS

Teste	Data	Frequência	Método	Resultado	Limite Máximo	Responsável
Bactérias Heterotróficas		Mensal	SMWW 9215B		< 500 UFC/ mL	

Manutenção das Cepas de Referência

A técnica de Gram, mundialmente conhecida como coloração de Gram, é um método de coloração de bactérias desenvolvido pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram permite diferenciar bactérias com diferentes estruturas de parede celular a partir das colorações que estas adquirem após tratamento com agentes químicos específicos. O método consiste em tratar sucessivamente um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os reagentes violeta de genciana, lugol, etanol-acetona fucsina. As bactérias que adquirem a coloração azul violeta são chamadas de Gram-positivas e aquelas que adquirem a coloração vermelho são chamadas de Gram-negativas.

Procedimento Técnico

Materiais necessários Cepas padrão: ATCC® (American Type Culture Collection)

Parâmetro	Resultado esperado
Staphylococcus aureus ATCC® 25923	Cocos Gram Positivos: Células esféricas coradas em tonalidade violeta
Escherichia coli ATCC® 25922	Bacilos Gram Negativos: Células em formato de bastão coradas em tonalidade rósea
Pseudomonas aeruginosa ATCC® 27853	Bacilo Gram-Negativo: Bastão reto, não esporulado, móvel, contendo um flagelo polar em tonalidade rósea
Klebsiella pneumoniae ATCC® 13883	Bacilo Gram-Negativo: encapsulada, anaeróbia facultativa em forma de bastonete, não móvel
Coloração de Fundo o fundo da lâmina	Apresenta-se límpido e isento de sujidades ou precipitados

a- Preparar as lâminas para coloração:

- Materiais líquidos: espalhar o material sobre uma lâmina limpa e desengordurada, deixar secar ao ar e fixar o material passando a lâmina pela chama do bico de Bunsen, deixar resfriar;
- Material de culturas em meio sólido: usando uma alça, colocar uma gota de água estéril no centro de uma lâmina limpa e desengordurada, e em seguida pegar a alçada de uma colônia bacteriana, emulsionar na água estéril, deixar secar ao ar e fixar o material na chama de um bico de Bunsen, deixar resfriar;
- Amostras diretas: Espalhar a amostra no centro de uma lâmina limpa e desengordurada, deixar secar ao ar, e em seguida fixar passando-a pela chama de um bico de Bunsen, deixando resfriar;

b- Coloração:

- Cobrir o material com a solução de violeta genciana e deixar atuar por um minuto, lavando em água corrente rapidamente;

- Cobrir a lâmina com o lugol fraco e deixar atuar um minuto; -
- Remover o lugol da lâmina gotejando sobre está a solução descolorante até que o líquido se torne incolor (em torno de 15 segundos); -
- Lavar em água corrente e cobrir a lâmina com a solução para Gram (deixando atuar por 30 a 60 segundos); -
- Lavar com água corrente, deixar secar na posição vertical e observar ao microscópio usando a objetiva de imersão (100x de aumento total).

c- Precauções e cuidados especiais

- Esfregaços muito delgados ou muito espessos dificultam o processo de coloração;
- Cuidar na etapa da descoloração, pois a falta ou o excesso podem igualmente prejudicar o resultado;

As células microbianas que apresentarem escura são consideradas Gram positivas ao passo que as coradas em tonalidade avermelhada são consideradas Gram negativas. Estruturas como células epiteliais, leucócitos e muco coram tonalidade avermelhada.

15. RESULTADO DOS TESTES

Os critérios de aceitação utilizados para a verificação do método foram:

Linearidade: $R^2 \geq 0,995$; Se $G_{superior}$ ou $G_{inferior} \geq 1,156$ o valor aberrante para $n = 3$ a 5%: as variâncias podem ser consideradas iguais e as respostas instrumentais são homoscedásticas (H_0).

Recuperação: todas as fortificações devem ter resultado dentro de $\pm 20\%$ do valor de referência e desvio padrão relativo (coeficiente de variação), com valor de no máximo 20%.

Repetibilidade e precisão intermediária:

Foi avaliado o valor do desvio padrão relativo (coeficiente de variação), com valor de no máximo 20%.

LQ: Pelo cálculo de LQ, compostos que obtiveram LQs em concentrações menores que a concentração do primeiro ponto da sua respectiva curva de calibração. Visto isso, foi padronizado que, nesses casos, o valor do LQ será correspondente à concentração do primeiro ponto da curva de calibração.

Os resultados obtidos, deveram ser apresentados no FO 074 Relatório de Validação de Método Analítico de cada composto avaliado.

16. ANEXOS

FO 074 Relatório de Validação de Método Analítico

FO 212 Declaração de Validade do Método

17. BIBLIOGRAFIA

1. DOC-CGECRE-008rev09 ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: Junho, 2020.
2. EURACHEM Guide: *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Magnusson, B. and U. Örnemark (Ed.), 2014.
3. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 23rd Ed.
4. Guia Nacional de Preservação de Amostras, disponível em: <http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf>.
5. CALDWELL, E.L. & L.W. PARR. 1933. Present status of handling water samples—Comparison of bacteriological analyses under varying temperatures and holding conditions, with special reference to the direct method. Amer. J. Pub. Health 23:467.
6. AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DOS EUA. 1992. Regulamento Nacional de Água Potável Primária: Técnicas analíticas; Bactérias Coliformes; Regra final. 40 CFR Parte 141; Fed. Reg. 57:24744.
7. U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1994. National Primary and Secondary Drinking Water Regulation: Analytical methods for regulated drinking water contaminants; Final Rule. 40 CFR Parts 141 & 143; Fed. Reg. 59:62456.

18. PLANO DE TRABALHO

METAS	DESCRIÇÃO	EXECUÇÃO
1	21/03/2022: Planejamento dos ensaios de validação e definição do cronograma para execução.	Raphael Fernandes Amanda K. P. Zago
2	23/03/2022: Preparo das amostras para ensaio de LD e LQ. Avaliação parcial dos dados.	Raphael Fernandes Amanda K. P. Zago Maria Julia Mielli
3	25/03/2022: Preparo das amostras para ensaio de Repetibilidade do método em 3 níveis. Avaliação parcial dos dados.	Raphael Fernandes Amanda K. P. Zago Maria Julia Mielli
4	28/03/2022: Preparo das amostras para ensaio de Precisão Intermediária do método. Avaliação parcial dos dados.	Raphael Fernandes Amanda K. P. Zago Maria Julia Mielli
5	01/04/2022: Preenchimento dos documentos de Validação FO 074 Relatório de Validação de Método Analítico	Raphael Fernandes Amanda K. P. Zago Maria Julia Mielli
6	02/04/2022: Revisão, avaliação e discussão final do resultados para aprovação.	Raphael Fernandes Amanda K. P. Zago Maria Julia Mielli

**FORMULÁRIO**

Código FO 184

Aprovada em 02/03/2020

Título

PLANO DE VALIDAÇÃO E VERIFICAÇÃO DE MÉTODOS

Revisão
02Página
21/21**19. APROVAÇÃO**

NOME/FUNÇÃO	Raphael Fernandes/ Gerente Técnico	Amanda K. P. Zago/ Analista de Laboratório	Maria Julia Mieli/ Analista de Laboratório
AÇÃO	Planejamento	Participação	Participação
DATA	21/03/2022	21/03/2022	21/03/2022

ST ANALÍTICA
Análises Químicas

1. Metodologia Validada Coliformes totais e Escherichia coli – Determinação Quantitativa pela Técnica de Múltiplos Poços (Quantitray/2000) – NMP (Substrato Enzimático)

Parâmetro: Coliformes totais e Escherichia coli

Faixa: <1 a >2419.6 NMP/100 mL

Nome do Método de Ensaio: SMWW 23a Edição, 2017, Método 9223B 4.c

2. Matriz

Água bruta, água tratada, água para consumo humano e efluente.

3. Equipamentos/ Instrumentos

Nome	Código	Certificado	Incerteza
Estufa Bacteriológica	AB-EQ-148	E43334A/19	± 0,2 °C
Micropipeta 1 à 10 mL	AB-EQ-163	EVV-12072-01/2019	± 0,014 ml
Micropipeta 100 à 1000 µL	AB-EQ-463	EVV-10287-08RV01/2018	± 0,82 µl
Micropipeta 10 à 100 µL	AB-EQ-553	E23289/19	± 0,050 µl

4. Padrões/Reagentes

Nome	Código	Validade	Certificado	Incerteza
K. pneumoniae ATCC13883 – Lot: 351-74-5	1322-37593/2022	31/05/2023	351-74-5	N/A
Escherichia coli ATCC25922 – Lot: 335-534-2	295-37593/2022	31/08/2023	335-534-2	N/A
P. aeruginosa ATCC27853 – Lot: 353-474-4	296-37593/2022	30/04/2023	353-474-4	N/A
QF-Coli Quimaflex Científica Lot: 220117073	3548-36497/2022	18/01/2023	220117073	N/A
Colilert Idexx Lot: HT52B	3548-36502/2022	12/11/2022	HT52B	N/A
Frasco Estéril com Tiosulfato de Sódio 1mg	4363-36497/2022	23/04/2023	20210423	N/A

5. Período de realização

21/03/2022 a 02/04/2022

6. Aprovação/ Parecer Técnico

 Visto do Analista Responsável: Amanda Zago Data: 02/04/2022

7. Aprovação da Gerência Técnica

(X) Aprovado () Reprovado

 Visto do Aprovador: Raphael Data: 02/04/2022

8. Parâmetros analisados

- Seletividade
 Linearidade
 Limite de Detecção
 Limite de Quantificação
 Recuperação
 Precisão (repe e/ou repro)
 Robustez

Limite de detecção e Limite de quantificação

Legenda:
Resultados
Entrada de dados

Data da execução: 23/03/2022 a 24/03/2022

Concentração (NMP/100mℓ)	Resposta	Dev. padrão (s)	L.D. (NMP/100mℓ)	L.Q. (NMP/100mℓ)
<1 NMP/100mℓ	24,3	0,378	0,119	0,378
	24,3			
	24,3			
	24,3			
	24,3			
	24,3			
	23,3			
Dev. Padrão (s)	0,37796			
Média (X_m)	24,157			

 Se $s \neq 0 \Rightarrow LD = X_m + t.s$

 Se $s = 0 \Rightarrow LD = t.s$

 Valor de t unilateral para 99% de confiança: 3,14

Observação:

 O LD foi Calculado pelo branco da Amostra com Adição da menor Concentração aceitável do Analito $LD = 0 + t(n-1,1-a).S$ ou seja, 3,143 vezes o

 O LQ foi Calculado pelo branco da Amostra com Adição da menor Concentração aceitável do Analito $LQ = 0 + 10.s$ ou seja, desvio padrão amostral vezes 10.

Conclusão:
LD = 0,153
LQ = 0,488

Observações: LD e LQ foi cálculo pela adição de uma cepa padrão de Escherichia coli em um branco de amostra (água estéril) e analisado quantitativamente pela técnica de inoculação em poços múltiplos (Quanti-Tray 2000)



Aprovador

Repetitividade

Legenda:

Resultados

Entrada de dados

Data da execução: 25/03/2022 a 26/03/2022

Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.	C.V.					
Nível 1	Nível 2	Nível 3	7	30,50000	29,64	0,802	2,71%					
								Klebsiela. pneumoniae ATCC13883 + QF-Coli				
									Escherichia coli ATCC25922 + QF-Coli			
										Pseudomonas aeruginosas ATCC27853 + QF-Coli		
											Amanda K. P. Zago	
												25/03/2022 a 26/03/2022
2												
	3											
		4										
			5									
				6								
					7							
						1						
2												
	3											
		4										
			5									
				6								
					7							
						1						
2												
	3											
		4										
			5									
				6								
					7							

Limite de repetitividade Nível 1		Limite de repetitividade Nível 2		Limite de repetitividade Nível 3	
$t_{\text{tab}} (95\%)$	1,94	$t_{\text{tab}} (95\%)$	1,94	$t_{\text{tab}} (95\%)$	1,94
n	7	n	7	n	7
s	0,80200	s	1,33600	s	0,00000
r	2,20035	r	3,66542	r	0,00000

Conclusão:

 Critério de aceitação para $CV \leq 20\%$ para medidas de propriedade.



Aprovador

Reprodutibilidade

Legenda:

Resultados

Entrada de dados

		1,00	Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.	Variância
		1,00					
Nível 1	Operator: Maria Julia Mieli	Klebsiela. pneumoniae ATCC13883 + Colilet - Idexx	1	29,0000	29,36	1,046	1,093406593
			2	27,5000			
			3	27,5000			
			4	29,0000			
			5	30,5000			
			6	29,5000			
			7	30,5000			
	Operator: Amanda K. P. Zago	25/03/2022 a 26/03/2022	1	30,5000			
			2	29,0000			
			3	30,5000			
			4	29,0000			
			5	29,0000			
			6	30,5000			
			7	29,0000			

Limite de reprodutibilidade Nível 1	
$t_{\text{tab}} (95\%)$	1,94
n	7
S_R	1,046
R	2,86978
$DPRr = C.V.$	3,56%

$DPRr_{\text{(teórico)}}$	2,000
HORRAT	0,017813

$$DPRr = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Conclusão:

 Critério de aceitação para $CV \leq 20\%$.

 Valor de HORRAT ≤ 2 , os valores da reprodutibilidade do método são satisfatórios.

Reprodutibilidade

Legenda:

Resultados

Entrada de dados

		1,00	Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.	Variância
		1,00					
Nível 2	Operador: Maria Julia Mieli	Escherichia coli ATCC25922 + Colilet - Idexx	1	51,2000	53,98	1,892	3,578736264
			2	51,2000			
			3	53,6000			
			4	56,1000			
			5	56,1000			
			6	53,6000			
			7	51,2000			
	Operador: Amanda K. P. Zago	25/03/2022 a 26/03/2022	1	56,1000			
			2	53,6000			
			3	56,1000			
			4	56,1000			
			5	53,6000			
			6	53,6000			
			7	53,6000			

Limite de reprodutibilidade	
Nível 2	
$t_{\text{tab}} (95\%)$	1,94
n	7
S_R	1,892
R	5,19084
$DPRr = C.V.$	3,51%

$DPRr$ (teórico)	2,000
HORRAT	0,017525

$$DPRr = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

Conclusão:

 Critério de aceitação para $CV \leq 20\%$.

 Valor de HORRAT ≤ 2 , os valores da reprodutibilidade do método são satisfatórios.

Reprodutibilidade

Legenda:

Resultados

Entrada de dados

			1,00	Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.	Variância
			1,00					
Nível 3	Operador: Maria Julia Mieli	Pseudomonas aeruginosas ATCC27853 + Collert - Idexx	1	0,0000	0,00	0,000	0,000000000	
			2	0,0000				
			3	0,0000				
			4	0,0000				
			5	0,0000				
			6	0,0000				
			7	0,0000				
	Operador: Amanda K. P. Zago	25/03/2022 a 26/03/2022	1	0,0000				
			2	0,0000				
			3	0,0000				
			4	0,0000				
			5	0,0000				
			6	0,0000				
			7	0,0000				

Limite de reprodutibilidade Nível 3	
$t_{\text{tab}} (95\%)$	1,94
n	7
S_R	0,000
R	0,00000
$DPR_r = C.V.$	#DIV/0!

DPR_r (teórico)	2,000
HORRAT	#DIV/0!

$$DPR_r = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Conclusão:

 Critério de aceitação para $CV \leq 20\%$.

 Valor de HORRAT ≤ 2 , os valores da reprodutibilidade do método são satisfatórios.



Aprovador

Seletividade

Legenda:

Resultados

Entrada de dados

Tipo de Teste: Quantitativo - QF-Coli

Matriz: Água Tratada		Controle: Cepa: E.coli	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	30,50000	29,75	0,866
2	29,00000		
3	29,00000		
4	30,50000		
		Variância	0,75000

F_{calc}	2,954
$F_{tab (95\%)}$	9,277
n_1	4
n_2	4
n_1-1	3
n_2-1	3
$S_{agrupado}$	1,832

Matriz: Água Bruta		Controle: Cepa: E.coli	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	32,10000	30,93	1,489
2	30,50000		
3	32,10000		
4	29,00000		
		Variância	2,21583

média variância	1,483
t_{calc}	0,45
$t_{tab (95\%)}$	2,35

Matriz: Água Tratada		Controle: Cepa: K. pneumoniae	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	53,60000	55,27	1,443
2	56,10000		
3	56,10000		
4	53,60000		
		Variância	2,08333

F_{calc}	2,910
$F_{tab (95\%)}$	9,277
n_1	4
n_2	4
n_1-1	3
n_2-1	3
$S_{agrupado}$	3,047

Matriz: Água Bruta		Controle: Cepa: K. pneumoniae	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	58,80000	56,33	2,462
2	56,60000		
3	58,80000		
4	53,60000		
		Variância	6,06333

média variância	4,073
t_{calc}	0,25
t_{tab (95%)}	2,35

Matriz: Água Tratada		Controle: Cepa: P. aeruginosa	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	0,000	0,00	0,000
2	0,000		
3	0,000		
4	0,000		
		Variância	0,00000

F_{calc}	#DIV/0!
F_{tab (95%)}	9,277
n₁	4
n₂	4
n₁-1	3
n₂-1	3
S_{agrupado}	0,000

Matriz: Água Bruta		Controle: Cepa: P. aeruginosa	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	0,000	0,00	0,000
2	0,000		
3	0,000		
4	0,000		
		Variância	0,00000

média variância	0,000
t_{calc}	#DIV/0!
t_{tab (95%)}	2,35

Obs: Caso sejam testadas mais de uma matriz, criar nova aba de seletividade.

A Matriz não tem efeito importante sobre os resultados ($F_{calc} < F_{tab}$) ou se os testes nas matrizes forem iguais aos testes em água estéril

O Método é seletivo, sendo $t_{calc} < t_{tab}$ ou se os resultados dos testes qualitativos forem satisfatórios.



Aprovador

Seletividade

Legenda:

Resultados

Entrada de dados

Tipo de Teste: Quantitativo - Colilert

Matriz: Água Tratada		Controle: Cepa: E.coli	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	29,0000	28,25	0,866
2	27,5000		
3	27,5000		
4	29,0000		
		Variância	0,75000

F_{calc}	6,271
$F_{tab (95\%)}$	9,277
n_1	4
n_2	4
n_1-1	3
n_2-1	3
$S_{agrupado}$	2,145

Matriz: Água Bruta		Controle: Cepa: E.coli	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	30,5000	30,55	2,169
2	32,1000		
3	27,5000		
4	32,1000		
		Variância	4,70333

média variância	2,727
t_{calc}	0,76
$t_{tab (95\%)}$	2,35

Matriz: Água Bruta		Controle: Cepa: K. pneumoniae	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	51,2000	53,63	2,341
2	51,2000		
3	53,6000		
4	56,1000		
		Variância	5,48250

F_{calc}	1,171
$F_{tab (95\%)}$	9,277
n_1	4
n_2	4
n_1-1	3
n_2-1	3
$S_{agrupado}$	4,335

Matriz: Água Tratada		Controle: Cepa: K. pneumoniae	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	56,1000	58,47	2,164
2	60,5000		
3	58,8000		
4	56,1000		
		Variância	4,68250

média variância	5,083
t_{calc}	0,79
t_{tab (95%)}	2,35

Matriz: Água Bruta		Controle: Cepa: P. aeruginosa	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	0,000	0,00	0,000
2	0,000		
3	0,000		
4	0,000		
		Variância	0,00000

F_{calc}	#DIV/0!
F_{tab (95%)}	9,277
n₁	4
n₂	4
n₁-1	3
n₂-1	3
S_{agrupado}	0,000

Matriz: Água Bruta		Controle: Cepa: P. aeruginosa	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	0,000	0,00	0,000
2	0,000		
3	0,000		
4	0,000		
		Variância	0,00000

média variância	0,000
t_{calc}	#DIV/0!
t_{tab (95%)}	2,35

A Matriz não tem efeito importante sobre os resultados ($F_{calc} < F_{tab}$) ou se os testes nas matrizes forem iguais aos testes em água estéril

O Método é seletivo, sendo $t_{calc} < t_{tab}$ ou se os resultados dos testes qualitativos forem satisfatórios.



Aprovador

Seletividade

Legenda:

Resultados

Entrada de dados

Tipo de Teste: Quantitativo - Colilert

Matriz: EFB - QF-Coli		Controle: Cepa: E.coli	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	436,0000	426,00	11,547
2	416,0000		
3	436,0000		
4	416,0000		
		Variância	133,33333

F_{calc}	1,333
$F_{tab (95\%)}$	9,277
n_1	4
n_2	4
n_1-1	3
n_2-1	3
$S_{agrupado}$	21,213

Matriz: EFB - Colilert		Controle: Cepa: E.coli	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	416,0000	421,00	10,000
2	416,0000		
3	436,0000		
4	416,0000		
		Variância	100,00000

média variância	116,667
t_{calc}	0,17
$t_{tab (95\%)}$	2,35

Matriz: EFT - QF-Coli		Controle: Cepa: K. pneumoniae	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	168,9000	166,17	2,367
2	164,8000		
3	164,8000		
4	168,9000		
		Variância	5,60333

F_{calc}	1,115
$F_{tab (95\%)}$	9,277
n_1	4
n_2	4
n_1-1	3
n_2-1	3
$S_{agrupado}$	4,465

Matriz: EFT - Colilert		Controle: Cepa: K. pneumoniae	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	164,8000	166,47	2,500
2	164,8000		
3	169,8000		
4	164,8000		
		Variância	6,25000

média variância	5,927
t_{calc}	0,05
t_{tab (95%)}	2,35

Matriz: EFB - QF-Coli		Controle: Cepa: P. aeruginosa	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	0,000	0,00	0,000
2	0,000		
3	0,000		
4	0,000		
		Variância	0,00000

F_{calc}	#DIV/0!
F_{tab (95%)}	9,277
n₁	4
n₂	4
n₁-1	3
n₂-1	3
S_{agrupado}	0,000

Matriz: EFB - Colilert		Controle: Cepa: P. aeruginosa	
Nº Replicatas	Resultado	Média	Desv. Pad.
1	0,000	0,00	0,000
2	0,000		
3	0,000		
4	0,000		
		Variância	0,00000

média variância	0,000
t_{calc}	#DIV/0!
t_{tab (95%)}	2,35

A Matriz não tem efeito importante sobre os resultados ($F_{calc} < F_{tab}$) ou se os testes nas matrizes forem iguais aos testes em água estéril

O Método é seletivo, sendo $t_{calc} < t_{tab}$ ou se os resultados dos testes qualitativos forem satisfatórios.



Aprovador