

**Pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*:
Metodologia para acreditação do método normalizado**

Cristina Isabel Coelho Moutinho

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do
Grau de Mestre em Tecnologia Ambiental*

Orientador: **Professora Doutora Maria da Conceição Fernandes**

**Bragança
2013**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Maria da Conceição Fernandes, pelo apoio, amizade, dedicação, excelente orientação e essencialmente pelas palavras sábias que me transmitiu nos momentos mais complicados. Muito Obrigada!

À Dr^a Clarisse Santos pelo apoio na pesquisa bibliografia de algumas normativas de referência.

Um obrigada especial a todos os colaboradores e responsáveis do Laboratório Regional de Trás-os-Montes, nomeadamente à Dr^a Tonniete Cruz e Eng^o Francisco Morais por me terem aberto todas as portas e dado a possibilidade de aprofundar os meus conhecimentos na área laboratorial.

Obrigada à minha amiga Sílvia Vale e à sua família por todo o apoio, carinho e amizade que sempre demonstraram.

E por último mas de uma forma especial, agradecer à minha família, particularmente aos meus pais por terem acreditado em mim e permitido que este meu sonho se torna-se realidade.

A todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARS – Administração Regional de Saúde

CIPM - Comité Internacional de Pesos e Medidas

CNQ – Conselho Nacional de Qualidade

CQ – Controlo da Qualidade

DGS – Direcção Geral da Saúde

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EA - European Cooperation for Accreditation

EN – Erro Normalizado

IAF - International Accreditation Forum

IAPMEI – Instituto de Apoio às Pequenas e Médias Empresas

ILAC - International Laboratory Accreditation Cooperation

IPAC – Instituto Português da Acreditação

IPQ – Instituto Português da Qualidade

ID – Institutos Designados

ISO - International Organization for Standardization

LNM – Laboratórios Nacionais de Metrologia

MR – Materiais de Referência

MRC – Materiais de Referência Certificada

MSQ – Manual do Sistema da Qualidade

NMP - Número Mais Provável

PCA - Plate Count Agar

PDCA – Plan, Do, Check, Act

PR – Padrões de Referência

RT – Responsável Técnico

SI – Sistema Internacional

SQ – Sistema da Qualidade

SGQ – Sistema de Gestão da Qualidade

UE – União Europeia

UFC's – Unidades Formadoras de Colónias

VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia

RESUMO

A água, como qualquer outro componente dos sistemas naturais, contém uma grande quantidade e diversidade de microrganismos, sujeitos a alterações causadas por fatores ambientais e suscetíveis de alterar, simultaneamente, o ambiente envolvente. A *Pseudomonas aeruginosa* é exemplo de um desses microrganismos, cuja presença se tem verificado em águas de recreio e tem sido considerada como um indicador de qualidade microbiológica da água de piscinas públicas e semi-públicas com desinfecção. A sua presença encontra-se relacionada com a poluição fecal, direta ou indiretamente, sendo por isso indicadora das condições higiénicas da água. É uma bactéria oportunista, aeróbia, Gram-negativa, patogénica para o Homem, com elevada resistência a antibióticos e responsável por um grande número de infeções, de gravidade e localização diversificadas, nomeadamente tem sido relacionada com a alta incidência de otite externa em nadadores. Assim, torna-se necessário o estabelecimento de processos de monitorização, frequência de amostragem e análise da água, em função dos perigos e riscos decorrentes, e de acordo com a legislação em vigor.

O conhecimento e o estabelecimento dos métodos a utilizar para determinação de cada parâmetro é atualmente um requisito indispensável. Nesse contexto, este trabalho aborda a acreditação de metodologias analíticas de acordo com a NP EN ISO /IEC 17025:2005, fazendo nomeadamente uma revisão aos requisitos técnicos no âmbito da norma e reporta em particular a acreditação do método de pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* pela membrana filtrante.

Palavras-chave: Acreditação, NP EN ISO /IEC 17025:2005, *Pseudomonas aeruginosa*, Qualidade da água.

ABSTRACT

Water, like any other component of natural systems, contains a large quantity and diversity of microorganisms, subject to changes caused by environmental factors and susceptible to change both the surrounding environment. *Pseudomonas aeruginosa* is an example of one of those microorganisms whose presence has been noted in recreational waters and has been considered as an indicator of microbiological water quality of public pools and semi-public with disinfection. His presence is related to fecal pollution, directly or indirectly, being therefore indicative of hygienic conditions from the water. It is an opportunistic bacteria, aerobic gram-negative pathogenic for humans, with high resistance to antibiotics and responsible for a large number of infections, with severity and location varied, especially has been connected with the high incidence of external otitis in swimmers. So, it becomes necessary to establish monitoring processes, frequency of sampling and analysis of water, according to the hazards and risks, and according with the legislation in force.

The knowledge and the establishment of methods used to determining each parameter is currently an essential requirement. In this context, this study discusses the accreditation of analytical methodologies according to NP EN ISO / IEC 17025:2005, doing namely a review to the technical requirements as part of the standards and reports especially the accreditation of the method of research and quantification of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filter.

Keywords: Accreditation, NP EN ISO /IEC 17025:2005, *Pseudomonas aeruginosa*, Water Quality.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE GERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
1 – Enquadramento	1
2 - Qualidade, Certificação e Acreditação	3
2.1. Definição de Qualidade.....	3
2.1.1. Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ).....	3
2.1.2. Princípios de Gestão da Qualidade	4
2.1.3. Organização Internacional de Padronização.....	7
2.1.4. As Normas da Família ISO 9000	8
2.2. Certificação pela ISO 9001:2008	10
2.2.1. Contexto Mundial.....	11
2.2.2. Contexto Europeu e Nacional	12
2.2.3. Motivação para a Certificação ISO 9001	14
2.2.4. Vantagens e Desvantagens da Certificação ISO 9001	15
2.2.5. O Processo de Certificação.....	18
2.3. A Acreditação.....	20

2.3.1. Instituto Português de Acreditação (IPAC)	20
2.3.2. Processo de Acreditação	21
2.3.3. Certificado de Acreditação	22
2.3.4. Vantagens e Dificuldades da Acreditação	25
2.3.5. Acreditação <i>versus</i> Certificação de Laboratórios	27
3 - Acreditação pela NP EN ISO/IEC 17025	28
3.1. Introdução à Norma	28
3.2. Requisitos Técnicos da Norma.....	29
3.3. Interação das Normas NP EN ISO 9001 e NP EN ISO /IEC 17025	42
3.3.1. Sistemas de Gestão da Qualidade no Laboratório	44
4 - Acreditação de Métodos Microbiológicos	48
4.1. Introdução	48
4.2. Implementação do Método.....	48
4.2.1. Pessoal	49
4.2.2. Instalações.....	50
4.2.3. Controlo Ambiental.....	53
4.2.4. Higiene	54
4.3. Validação do Método.....	54
4.4. Incerteza da Medição	55
4.5. Equipamento: Manutenção, Calibração e Verificação	56
4.6. Reagente e Meios de Cultura	61
4.7. Rotulagem	63
4.8. Materiais e Culturas de Referência.....	63
4.9. Amostragem	64
4.10. Manuseamento e Identificação da Amostra	65

4.11. Remoção do Lixo Contaminado.....	66
4.12. Controlo da Qualidade do Desempenho	66
4.13. Relatórios de Ensaios.....	67
5 – Caso de Estudo: Acreditação do Método de Pesquisa e Quantificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
5.1. Qualidade das Águas das Piscinas.....	68
5.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71
5.2.1. Manifestações Clínicas.....	72
5.3. Pesquisa e Quantificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	73
5.3.1. Princípio do Método.....	74
5.3.2. Meios de Cultura e Reagentes	76
5.4. Validação do Método.....	77
5.4.1. Procedimento do Ensaio	78
5.4.2. Registos	81
6 – Considerações Finais.....	86
7 - Referências Bibliográficas	87
ANEXO A – Registos	94
ANEXO B – Equipamento	99
ANEXO C - Utilização de Culturas de Referência.....	104
ANEXO D – Metodologia de acordo com a ISO 16266:2008.....	106
ANEXO E- Registos <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Metodologia PDCA	6
Figura 2.2 - Evolução da certificação ISO 9001 a nível mundial.....	11
Figura 2.3 - Evolução do número de certificados ISO 9001 (%o habitantes) para a União Europeia e Portugal.....	12
Figura 2.4 - Evolução do número de certificados ISO 9001 (%o habitantes).	13
Figura 2.5 - Evolução da percentagem de empresas com certificados segundo a norma ISO 9001.	14
Figura 2.6 - Ciclo de Certificação	19
Figura 2.7 - Avaliação da competência técnica	20
Figura 2.8 - Etapas do processo de Acreditação pelo IPAC	22
Figura 2.9 - Certificado de Acreditação e Anexo Técnico.....	22
Figura 2.10 - Anexo Técnico Eletrónico.....	23
Figura 2.11 - Símbolos de Acreditação.....	24
Figura 2.12 - Símbolos internacionais conjugados.....	24
Figura 3.1 - Cadeia de Rastreabilidade Metrológica	37
Figura 3.2 - Interação das normas ISO 9001 e ISO 17025	44
Figura 3.3 - Estrutura básica de procedimentos necessários para a elaboração de um SGQ para Laboratórios.	46
Figura 3.4 - Pirâmide de documentos e registos.....	47
Figura 5.1 - <i>Pseudomonas sp</i> : bacilos Gram-negativos.....	71
Figura 5.2 - Tipos comuns de infeção por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	73
Figura 5.3 - Etapas do processo de Filtração por Membrana para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75

Figura 5.4 - Meio CN Agar com presença de *Pseudomonas* 76

Figura 5.5 - Fluxograma para pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* segundo a ISO 16266. 80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Princípios de Gestão da Qualidade e exemplos da sua aplicação prática.	5
Tabela 2.2 - Referenciais Normativos de SGQ, Estrutura e Campo de Aplicação.	9
Tabela 2.3 - Principais motivações para a implementação da ISO 9001.	15
Tabela 2.4 - Principais benefícios internos e externos na certificação da ISO 9001.	17
Tabela 2.5 - Principais dificuldades na certificação ISO 9001.	18
Tabela 3.1 - Requisitos Técnicos Essenciais de acordo com a ISO 17025.	30
Tabela 5.1 - Controlo da qualidade microbiológica da água de piscinas, valores limite e frequência de amostragem.	70
Tabela 5.2 - Indicadores mais comuns de qualidade da água das piscinas, sua origem, valores admissíveis e frequência de amostragem.	71
Tabela 5.3 - Vantagens e desvantagens da filtração por membrana em relação à inoculação de tubos múltiplos e determinação do NMP.	74
Tabela 5.4 - Composição do meio CN Agar.	77
Tabela 5.5 - Interpretação dos resultados na deteção e quantificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	79
Tabela 5.6 - Controlo de qualidade positivo e negativo para os meios de cultura.	83
Tabela 5.7 - Controlo Interno da Qualidade.	85

1 – Enquadramento

A qualidade está na base do sucesso no mundo empresarial, sendo um fator de competitividade e de diferenciação entre organizações. De facto, o desenvolvimento de uma cultura baseada na qualidade abre caminho à eficácia e eficiência organizacional proporcionando um maior lucro com menos custos.

Um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) é amplamente entendido como o envolvimento de todos os colaboradores da organização, num processo de concretização do fornecimento de serviços/produtos que correspondam às exigências específicas do cliente.

No que diz respeito aos laboratórios de calibração e de ensaios, a disponibilidade do sistema da qualidade constitui indicação necessária, mas não suficiente, já que também é imprescindível demonstrar a competência técnica do laboratório. Em consonância com as práticas internacionais, torna-se indispensável mostrar aos clientes e usuários dos serviços do laboratório que os certificados de calibração e os relatórios de ensaios são metrologicamente confiáveis. Relativamente à formalização da credibilidade laboratorial o instrumento a ser adotado não deve ser a certificação ISO 9001 do Sistema da Qualidade do laboratório, mas sim a sua acreditação pelo referencial ISO 17025, uma vez que esta, além do Sistema da Qualidade, também atesta a competência do laboratório.

Neste contexto, esta dissertação analisa a metodologia a implementar para a acreditação de métodos, através de uma revisão bibliográfica e do estudo de caso, sendo fundamental demonstrar que os laboratórios utilizam métodos conducentes a resultados confiáveis, que garantam qualidade, idoneidade e credibilidade aos seus produtos e/ou serviços.

Assim, é abordada a pertinência dos procedimentos, uso adequado de equipamentos, instalações apropriadas e capacidade profissional do pessoal do laboratório, seguindo os requisitos gerais da norma internacional para a competência de laboratórios de calibração e ensaios – NP EN ISO 17025. Em particular será discutida a validação do método para pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*.

A dissertação encontra-se organizada em seis capítulos. O primeiro capítulo corresponde a um enquadramento do estudo realizado e à descrição geral da organização da tese escrita. No segundo capítulo apresenta-se uma breve revisão bibliográfica, no qual se aborda o tema da certificação, da qualidade e acreditação, tendo como referenciais as normas ISO 9001 e ISO 17025, os seus objetivos, dificuldades e impacto nas organizações. No terceiro capítulo, a fim de estudar em concreto a acreditação e a sua importância na competência de laboratórios de calibração e ensaios, efetua-se uma breve descrição dos requisitos gerais para a acreditação e procedeu-se a uma revisão detalhada da norma internacional NP EN ISO /IEC 17025. No quarto capítulo é dada ênfase aos requisitos da norma para acreditação dos métodos microbiológicos, demonstrando a sequência do planeamento através de um rigoroso programa de Garantia da Qualidade, sendo discutidos os requisitos específicos em termos de equipamentos, instalações, pessoal e controlo ambiental. No quinto capítulo é apresentado o caso de estudo, pesquisa e quantificação da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em águas de piscina, bem como se detalha a metodologia de implementação e discutidas as evidências necessárias para a validação do método. No último capítulo são sintetizadas as principais conclusões alcançadas neste estudo e finalmente é apresentada a listagem da bibliografia utilizada para a realização deste trabalho.

2 - Qualidade, Certificação e Acreditação

2.1. Definição de Qualidade

Atualmente, num mercado altamente competitivo e num clima económico incerto, a qualidade tornou-se, em qualquer negócio, um fator crítico de sucesso. O fator de decisão para o cliente depende frequentemente da qualidade do produto ou serviço de uma empresa, sobrepondo-se cada vez mais ao aspeto monetário. Assim, uma das maneiras das empresas demonstrarem aos clientes a sua capacidade para fornecer produtos e serviços de qualidade, é disporem de um sistema da qualidade bem desenhado, bem gerido e certificado.

O termo qualidade, para Oakland (2000), tem como significado ir *de encontro aos requisitos dos clientes*, às suas necessidades e expectativas. Já para Furtado (2003), qualidade consiste no conjunto de características que satisfazem as necessidades implícitas ou explícitas dos consumidores. Segundo o IPQ (2005), qualidade está relacionada com o *grau de satisfação de requisitos dados por um conjunto de características intrínsecas*.

A qualidade contribui para aumentar a competitividade e é decisiva para a sobrevivência das empresas em ambiente de grande disputa. A gestão efetiva da qualidade traduz-se na coordenação de vários elementos, aparentemente independentes, mas que na realidade interagem entre si formando um todo. Deste modo, não é de estranhar que os países mais desenvolvidos tecnologicamente, diante da necessidade de melhorar a qualidade dos seus produtos e serviços, criassem sistemas de gestão da qualidade para as suas indústrias e comércio.

2.1.1. Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ)

A par da definição da qualidade pode ainda definir-se SGQ *como o conjunto coerente e interatuante da estrutura organizacional, das responsabilidades, dos procedimentos, dos processos e dos recursos utilizados para implementar a Gestão da Qualidade* (Furtado, 2003). Um SGQ deve incluir todas as atividades que contribuem para a qualidade na organização, para que todos os procedimentos sejam identificados, assim como os seus objetivos e potenciais não conformidades, no futuro. Um SGQ deve ser

capaz de fazer decrescer os erros na produção ou produtos, para que a satisfação dos clientes seja cada vez maior.

Segundo Pinto e Soares (2010), um SGQ pode beneficiar toda a organização a vários níveis, tais como definir as prioridades na organização, melhorar a relação com os clientes, diminuir a incidência dos produtos não conformes, aumentar a motivação dos colaboradores, reduzir os custos inerentes ao controlo da qualidade, melhorar o clima organizacional, eliminar tarefas supérfluas e repetidas, e melhorar a imagem organizacional. Os autores definem-no, ainda, *como a filosofia e prática de gestão que se traduz no envolvimento de todos os que trabalham na organização num processo de cooperação que se concretize no fornecimento de produtos e serviços que satisfaçam as necessidades e expectativas dos clientes.*

Os sistemas de gestão da qualidade são ferramentas essenciais no sentido da prestação de um serviço com mais-valia para os clientes. Estes sistemas são ainda um modo de evidenciar externamente a qualidade dos serviços prestados pelas organizações. Assim, quando se aborda a melhoria da qualidade e o contributo para essa melhoria, num contexto genérico, fala-se muitas vezes nas melhorias da organização e gestão, dos processos de certificação, da avaliação da estrutura dos processos e dos seus resultados, bem como dos problemas inerentes à quantificação da qualidade.

A adoção de um sistema de gestão da qualidade, embora não sendo obrigatória por imposição legal, é um conjunto de medidas organizacionais que evidenciam que determinado nível de qualidade é alcançado. Além disso, quando é certificado permite, entre outros, ganhos significativos ao nível da eficiência e eficácia, melhoria da imagem perante o mercado e aumento da competitividade.

2.1.2. Princípios de Gestão da Qualidade

Existem oito Princípios de Gestão da Qualidade *que podem ser adotados pela gestão de topo de uma organização* para que esta seja levada a alcançar um melhor desempenho (IPQ, 2005). A tabela 2.1 apresenta um breve resumo de cada princípio que quando abordado eficazmente se traduz no sucesso sustentado duma organização.

Tabela 2.1 - Princípios de Gestão da Qualidade e exemplos da sua aplicação prática.

Princípios	Explicação
Focalização no cliente – as organizações dependem dos seus clientes e, conseqüentemente, devem satisfazer os seus requisitos atuais e futuros, e esforçarem-se por exceder as suas expectativas	Focalização no cliente significa que a organização dedica a sua energia na procura da satisfação dos seus clientes e compreende que é dessa satisfação que advém o lucro
Liderança – os líderes estabelecem a finalidade e a orientação da organização. Convém que criem e mantenham um ambiente interno que permita o pleno envolvimento das pessoas a fim de se atingirem os objetivos da organização	A liderança consiste em providenciar modelos comportamentais consistentes com os valores da organização – comportamentos que irão permitir alcançar os objetivos da organização. O ambiente interno inclui o clima, o estilo de gestão, os valores partilhados, a confiança, a motivação e o apoio
Envolvimento das pessoas – as pessoas, em todos os níveis, são a essência de uma organização e o seu pleno envolvimento permite que as suas aptidões sejam utilizadas em benefício da organização	Envolver as pessoas significa partilhar conhecimento, encorajar e reconhecer a sua contribuição, utilizar a sua experiência e trabalho com integridade
Abordagem por processos – um resultado desejado é atingido de forma mais eficiente quando as atividades e os recursos associados são geridos como um processo	Os processos são dinâmicos – fazem com que as coisas aconteçam. Os procedimentos são estáticos – ajudam as pessoas a cumprir uma tarefa
Abordagem da gestão como um sistema – identificar, compreender e gerir processos interrelacionados como um sistema contribui para que a organização atinja os seus objetivos com eficácia e eficiência	Os sistemas são construídos através da ligação de processos interrelacionados por forma a fornecer o objetivo do sistema, que neste caso consiste na satisfação das partes interessadas
Melhoria contínua – a melhoria contínua do desempenho global de uma organização deve ser um objetivo permanente dessa organização	A melhoria contínua consiste na melhoria progressiva no que concerne à eficácia e eficiência organizacional – não se trata da resolução de problemas, mas sim de ações corretivas e faz parte do controlo do processo
Tomada de decisões baseadas em factos – as decisões eficazes são baseadas na análise de dados e informações	Os factos são obtidos a partir de observações realizadas por pessoas qualificadas que utilizam meios qualificados – a integridade da informação é conhecida
Relações mutuamente benéficas com fornecedores – uma organização e os seus fornecedores são interdependentes e uma relação de benefício mútuo potencia a aptidão de ambas as partes para criar valor	Relações mutuamente benéficas são aquelas em que ambas as partes partilham conhecimento, visão, valores e compreensão. Os fornecedores são tratados como parceiros

(Adaptado de: IPQ, 2005)

Como já referido anteriormente, estes princípios devem estar presentes no SGQ de cada organização. A auditoria ao SGQ de uma organização tem como função avaliar a forma

como esta identifica e gere os seus processos, utilizando uma melhoria contínua. A metodologia PDCA (*Plan, Do, Check and Act* – Planear, Executar, Verificar e Atuar) ou o Ciclo de Deming, como também é conhecido, reflete a melhoria contínua, como se pode observar na figura 2.1.



Figura 2.1 - Metodologia PDCA (Adaptado de: APCER, 2010).

O ciclo PDCA começa pela planificação de ações, em seguida pela execução do conjunto de ações planeadas, verificando-se posteriormente se o que foi feito está de acordo com o planificado e, por último, tomam-se medidas para corrigir ou eliminar defeitos ou erros existentes. Todos estes pontos são executados de uma forma constante e repetida, ou seja, ciclicamente.

A planificação refere-se ao conjunto de ações estabelecidas para atingir resultados, onde se encontra a identificação da missão, metas e políticas da organização, assim como os procedimentos e processos necessários. A execução diz respeito à implementação de processos com a realização das atividades determinadas. A etapa da verificação está relacionada com a monitorização e medição de processos e resultados, tendo em conta os objetivos delineados. Por último, deve-se atuar de acordo com os relatórios produzidos na fase anterior, empreendendo ações para a melhoria contínua do desempenho dos processos, corrigindo eventuais falhas que possam ter ocorrido e revendo todo o sistema para verificar se este funciona e se está atualizado e adequado (Pires, 2007).

A melhoria contínua ocorre a cada execução do Ciclo PDCA e tem como objetivo otimizar a realização dos processos, possibilitar a redução de custos e o aumento da produtividade levando ao aperfeiçoamento e ajustamento do SGQ da organização. Desta forma, a melhoria contínua é a medida em que as atividades planeadas foram realizadas e se conseguiram obter os resultados estabelecidos. É a relação entre os resultados obtidos e os recursos utilizados e onde existe o envolvimento de todas as partes interessadas (colaboradores, fornecedores, clientes).

2.1.3. Organização Internacional de Padronização

A *Organização Internacional de Padronização*, em inglês *International Organization for Standardization*, é reconhecida internacionalmente pela sigla ISO. Independentemente da língua usada foi adotada a palavra grega “ISO” cujo significado é “igual”, como o nome padrão da sigla.

A ISO é uma organização não-governamental fundada em 1947, em Genebra, e hoje presente em cerca de 164 países. A sua função é a de promover a normalização de produtos e serviços, para que a qualidade dos mesmos seja permanentemente melhorada (<http://www.iso.org>). Em Portugal, o organismo de normalização e comité membro da ISO é o Instituto Português da Qualidade (IPQ).

O objetivo da ISO é facilitar o intercâmbio internacional de bens e serviços, e desenvolver a cooperação a nível intelectual, científica, tecnológica e económica, facilitando, assim, o comércio internacional. Antes da ISO, existiam outras normas nacionais e multinacionais do SGQ. *Estas foram desenvolvidas para as necessidades da indústria militar e nuclear e, em menor escala, para uso comercial e industrial. As várias normas tinham padrões diferentes em comum e ligações históricas. No entanto, não eram suficientemente consistentes na terminologia ou de conteúdo para uso generalizado no comércio internacional.* (Juran e Godfrey, 1998). A ISO veio, por conseguinte, normalizar todas estas questões.

A ISO já publicou mais de 19.500 normas internacionais, (<http://www.iso.org>), entre as quais consta a série de normas da família ISO 9000 (qualidade) e a ISO 14000 (ambiente), e as respetivas revisões efetuadas ao longo do tempo, como as mais utilizadas e transversais a todos os países.

2.1.4. As Normas da Família ISO 9000

As normas da família ISO 9000 são referenciais para a implementação de SGQ, orientando as organizações nas boas práticas da qualidade. Têm como objetivo garantir o fornecimento de produtos que satisfaçam os requisitos dos clientes, assim como a prevenção de problemas (não conformidades ou potenciais não conformidades). A família de normas da ISO 9000 visa ainda a melhoria contínua das organizações a fim de conseguirem desenvolver eficazmente os seus sistemas. A comprová-lo está o facto de terem já sido adotadas por mais de uma centena e meia de países, tendo-se demonstrado de tal modo atuantes, que quem a elas ainda não aderiu, ou não vier a aderir num futuro próximo, dificilmente conseguirá manter-se competitivo no mercado ou, mais ainda, conseguirá garantir a sobrevivência da sua empresa num horizonte de médio/longo prazo.

A família de normas relativas a sistemas de gestão da qualidade é constituída pelas seguintes normas (Pinto e Soares, 2010):

- ✓ NP EN ISO 9000:2005 – Fundamentos e vocabulário;
- ✓ NP EN ISO 9001:2008 – Requisitos;
- ✓ NP EN ISO 9004:2000 – Linhas de orientação para melhoria de desempenho;
- ✓ NP EN ISO 19011:2003 – Linhas de orientação para auditorias a sistemas de gestão de qualidade e/ou de gestão ambiental.

A revisão da ISO 9001:2008 veio trazer mais clareza relativamente à ISO 9001:2000 e compatibilidade com a ISO 14001:2004 (APCER, 2010). A tabela 2.2 apresenta o campo de aplicação de cada norma.

Tabela 2.2 - Referenciais Normativos de SGQ, Estrutura e Campo de Aplicação.

Norma	Campo de Aplicação
<p>NP EN ISO 9000:2005</p> <p>Sistemas de gestão da qualidade. Fundamentos e vocabulário.</p>	<p>Descreve os princípios fundamentais dos SGQ que são objeto das normas da família ISO 9000 e define os termos relacionados.</p>
<p>NP EN ISO 9001:2008</p> <p>Sistemas de gestão da qualidade. Requisitos.</p>	<p>Especifica os requisitos para um SGQ em que uma organização:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Necessita demonstrar a sua aptidão para proporcionar um produto que vá ao encontro dos requisitos do cliente e regulamentos aplicáveis; ✓ Visa aumentar a satisfação do cliente através da aplicação eficaz do sistema, incluindo processos para a melhoria contínua do sistema e para garantir a conformidade com os requisitos do cliente e regulamentos aplicáveis.
<p>NP EN ISO 9004:2000</p> <p>Sistemas de gestão da qualidade. Linhas de orientação para a melhoria do desempenho.</p>	<p>Proporciona linhas de orientação que estão para além dos requisitos dados na ISO 9001, de forma a considerar tanto a eficácia como a eficiência de um sistema de gestão da qualidade.</p> <p>Quando comparados com a ISO 9001, os objetivos de satisfação do cliente e de qualidade do produto são alargados de forma a incluir a satisfação das partes interessadas e o desempenho da organização.</p> <p>Não se destina a ser utilizada para propósitos de certificação, nem como guia de implementação da ISO 9001.</p>
<p>NP EN ISO 19011:2003</p> <p>Linhas de orientação para auditorias de sistemas de gestão da qualidade e/ou de gestão ambiental.</p>	<p>Indica linhas de orientação para a execução de auditorias a sistemas de gestão da qualidade e sistemas de gestão ambiental.</p>

(Adaptado de: Pinto e Soares, 2010)

Estas normas baseiam-se nos oito princípios de gestão da qualidade, já mencionados: a focalização no cliente; a liderança; o envolvimento das pessoas; a abordagem por processos; a abordagem da gestão como um sistema; a melhoria contínua; a tomada de decisão fundamentada em factos e as relações benéficas com os fornecedores.

2.2. Certificação pela ISO 9001:2008

A Norma ISO 9001 tem como finalidade especificar *requisitos para um sistema de gestão da qualidade que pode ser utilizado para aplicação interna pelas organizações, ou para certificação, ou para fins contratuais. Está focada na eficácia do sistema de gestão da qualidade para ir ao encontro dos requisitos do cliente* (IPQ, 2008).

Num mercado cada vez mais competitivo e em constante mutação é natural que as empresas procurem, todos os dias, alternativas e ferramentas para se tornarem mais competitivas e diferenciadoras dos seus concorrentes. Para tal, muito tem vindo a contribuir a certificação de SGQ de produtos e/ou serviços em empresas.

Segundo Ganhão e Pereira (1992), *certificar a conformidade de um produto ou serviço é a ação de comprovar que esse produto ou serviço está em conformidade com determinadas normas ou especificações*. Nos dias de hoje, os clientes sentem necessidade de terem a garantia de qualidade de um determinado produto ou serviço dada por uma entidade externa que seja independente dos produtores do mesmo, cumprindo determinados requisitos e especificações. Igualmente, quer seja a nível nacional ou internacional, as entidades que redigem a legislação, tentam encontrar métodos para que os produtos, processos ou serviços tenham a garantia de que cumprem com os requisitos legais estipulados (Ganhão e Pereira, 1992; Furtado, 2003). De acordo com Madeira *et al*, (2009), *a certificação garante, pelo menos, que existe uma elevada probabilidade de que as coisas sejam feitas de uma forma sistematizada, documentada e bem suportada, fornecendo por isso mesmo confiança*.

A obtenção da certificação ISO 9001 traduz o resultado do empenho de uma organização que, num processo de melhoria contínua, procura planear, executar, verificar e medir (ciclo PDCA) esses mesmos processos a fim de conseguir fazer sempre melhor, com menos custos e a um menor tempo possível (Coelho, 2006). No entanto, uma organização pode implementar um SGQ sem estar interessada na certificação deste sistema.

Uma organização que pretenda obter a certificação tem de possuir um conjunto de processos baseados nas normas ISO que estejam de acordo com a atividade da empresa. Esses processos e a forma da sua monitorização têm que estar devidamente documentados, tal como a evidência da *adesão da organização* a esses processos.

Posteriormente, realiza-se uma auditoria externa a esses processos para que se confirme a concordância em relação às normas ISO e se possa certificar a empresa, havendo a emissão de um certificado de conformidade, em caso de sucesso (Furtado, 2003).

A certificação é sempre efetuada por organismos de certificação independentes e acreditados para o efeito. No caso de Portugal é o Instituto Português de Acreditação (IPAC) que regula as entidades certificadoras (Ganhão e Pereira, 1992).

Assim, a certificação é o reconhecimento da implementação do SGQ de uma organização, por parte de terceiros, e pode ser definida como uma declaração documental, decorrente de uma avaliação independente, efetuada por uma entidade certificadora reconhecida e acreditada. Esta entidade comprova que o SGQ cumpre com os requisitos estabelecidos pela norma (Madeira et al., 2009; Pinto e Soares, 2010).

2.2.1. Contexto Mundial

De acordo com a última edição da ISO Survey (valores relativos a 31 de Dezembro de 2010), o número de entidades com sistemas de gestão da qualidade certificados de acordo com a norma ISO 9001 a nível mundial (Figura 2.2), aumentou ligeiramente, de 1064785 (2009) para 1109905 (2010), correspondendo a um aumento de 4%, refletindo assim, em parte, o abrandamento que se tem verificado nos últimos anos a nível do número total de certificados ISO 9001 mundialmente emitidos (Sampaio e Saraiva, 2012).

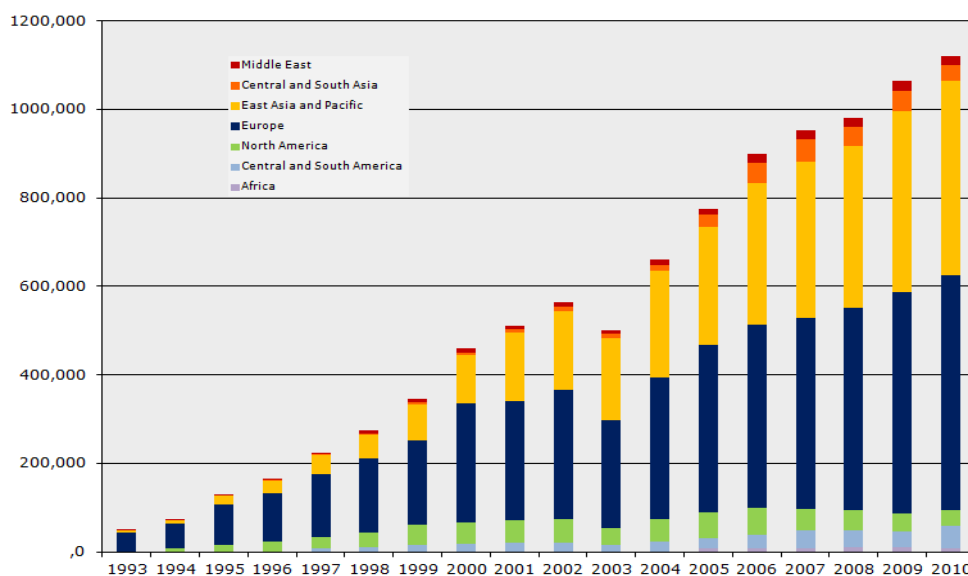


Figura 2.2 - Evolução da certificação ISO 9001 a nível mundial.
(Adaptado de: ISO Survey, 2010)

2.2.2. Contexto Europeu e Nacional

A figura 2.3 retrata, em termos médios, a evolução da certificação ISO 9001 na União Europeia, com base no número de certificados por 1000 habitantes. Como se pode verificar, e à exceção de alguns períodos temporais pontuais, a evolução tem sido positiva, com tendência de claro crescimento. Chama-se particular atenção para o período compreendido entre 2002 e 2003, altura em que ocorreu uma diminuição no valor médio do número de certificados ISO 9001, causada pelo facto de um número significativo de empresas não ter efetuado a transição para a versão da norma ISO 9001 do ano 2000 (Madeira et al., 2009).

Verifica-se ainda que durante todo o período analisado, Portugal cresceu abaixo do valor médio do número de certificados ISO 9001, quer considerando a União a 15 países, quer a 27, refletindo sinais de não convergência com a média europeia, no que diz respeito à certificação segundo a norma ISO 9001. Outro aspeto que sobressai da análise da figura 2.3 está relacionado com o comportamento da curva evolutiva da União Europeia a 27 países. O número médio de certificados ISO 9001 por 1000 habitantes a 15 países é superior em praticamente todo o período analisado, comparativamente ao respetivo valor médio a 27 países.

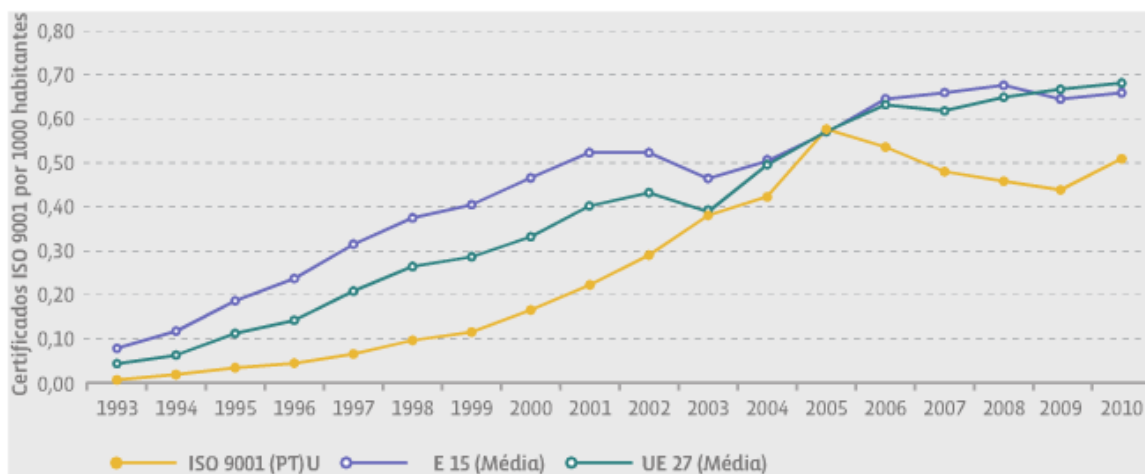


Figura 2.3 - Evolução do número de certificados ISO 9001 (% habitantes) para a União Europeia e Portugal (Adaptado de: Sampaio e Saraiva, 2012).

É também de destacar a estabilização/diminuição ocorrida de 2006 para 2007. Nos últimos anos tem-se verificado um abrandamento da taxa de crescimento do número de certificados ISO 9001 emitidos a nível mundial, o que se deve, em parte, a uma

tendência de estabilização do número de empresas certificadas em diversos países na Europa.

No caso específico de Portugal, de acordo com os dados da ISO Survey 2010 existiam 5588 organizações certificadas segundo a norma ISO 9001. A nível da certificação de sistemas de gestão da qualidade, e segundo os dados ISO, o ano de 2010 contrariou a tendência decrescente que se vinha a verificar desde 2007 (Sampaio e Saraiva, 2012).

Em 2010 existiam em Portugal, segundo dados facultados pelas empresas certificadoras, 7191 certificados atribuídos a entidades e organizações no âmbito do sistema de gestão da qualidade, emitidos pela norma ISO 9001, valor este que corresponde a 0,68‰ bem como a 15,4% das empresas com 10 ou mais colaboradores (Figura 2.4 e 2.5).

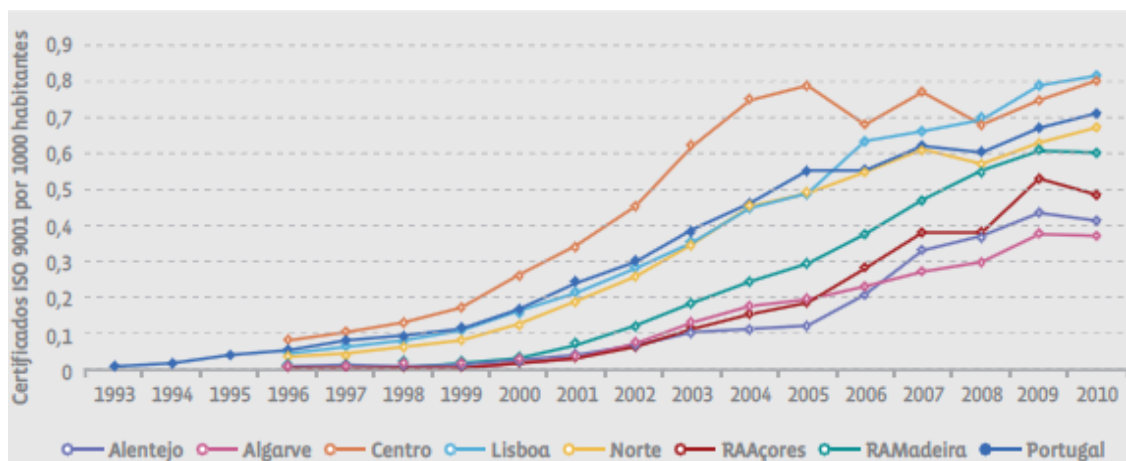


Figura 2.4 - Evolução do número de certificados ISO 9001 (‰ habitantes).
(Adaptado de: Sampaio e Saraiva, 2012)

Da figura 2.4 sobressai que se mantém a tendência de crescimento nas regiões do Centro e do Norte para valores de, respetivamente, 0,77‰ e 0,65‰ em 2010. Por outro lado, a análise da evolução da percentagem de empresas certificadas, nas diferentes regiões, mostra que a região Centro assume a liderança com aproximadamente 20% de empresas certificadas (com 10 ou mais colaboradores). No outro extremo encontra-se a região do Algarve com 7,5% de organizações certificadas.

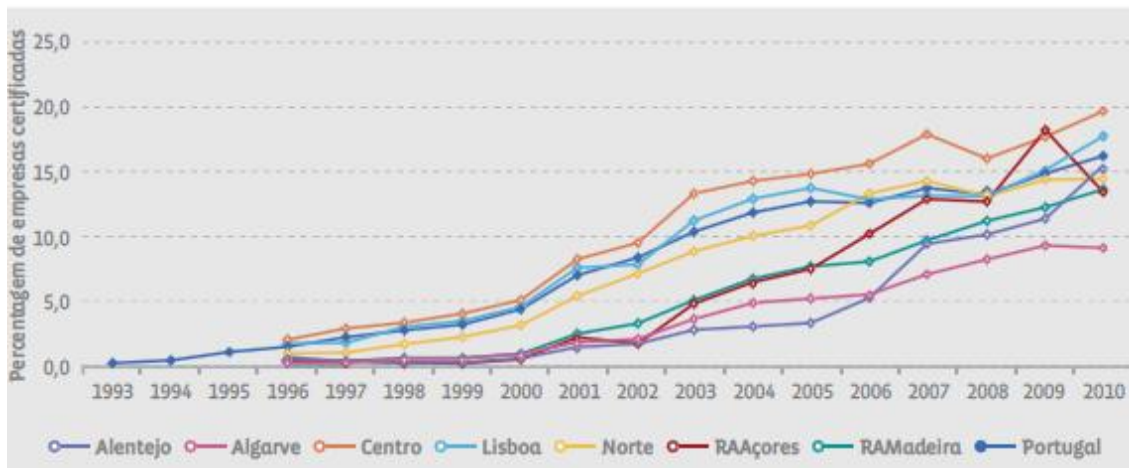


Figura 2.5 - Evolução da percentagem de empresas com certificados segundo a norma ISO 9001. (Adaptado de: Sampaio e Saraiva, 2012).

Segundo Furtado (2003), a certificação pela ISO 9001 deve-se muitas vezes a razões internas e externas às empresas, como a melhoria da organização em si e a melhoria da sua imagem. O autor refere, igualmente, que é após a certificação que as empresas apresentam melhores resultados e é também quando tentam melhorar as suas técnicas de gestão da qualidade.

2.2.3. Motivação para a Certificação ISO 9001

As motivações para a certificação podem ser motivações internas ou motivações externas. As primeiras estão relacionadas com a melhoria concreta organizacional interna, enquanto as segundas estão associadas ao marketing, questões promocionais e melhoria de imagem da organização (Buttle, 1997; Huarng et al., 1999; Corbett et al., 2003; Marimon et al., 2006; Miranda, 2006c; Feng et al., 2008; Prajogo, 2008; Sampaio et al., 2009). A tabela 2.3 apresenta as principais motivações para a implementação da ISO 9001.

Tabela 2.3 - Principais motivações para a implementação da ISO 9001.

Motivações Internas	Motivações Externas
Melhoria organizacional interna	Ferramenta de marketing
Aumento da produtividade	Questões promocionais
Melhoria da integração dos colaboradores	Melhoria de imagem da organização
Melhoria do SGQ	Requisitos dos clientes
	Pressão da concorrência
	Requisitos do mercado
	Acesso a novos mercados
	Seguimento das tendências
	Sustentação/melhoria da cotação das ações da empresa em bolsa

(Adaptado de: Sampaio et al., 2009)

Resumidamente, as principais motivações apresentadas para a certificação das empresas pela ISO 9001 são, a **nível interno**, a melhoria organizacional interna, o aumento da produtividade e melhoria da integração dos colaboradores; a **nível externo** são a vantagem a nível de marketing, nomeadamente a melhoria da imagem da organização e questões promocionais, requisitos dos clientes, pressão da concorrência, requisitos do mercado e possibilidade de entrada em novos mercados.

2.2.4. Vantagens e Desvantagens da Certificação ISO 9001

A certificação tem como vantagens a *evidência, inequívoca, junto dos colaboradores, dos clientes, e de outras partes interessadas dos esforços desenvolvidos pela organização ao nível da qualidade* (Pinto e Soares, 2010). A estes benefícios pode juntar-se ainda a vantagem publicitária que a organização terá quando divulgar junto da marca da empresa o símbolo da obtenção da sua certificação.

Existe uma relação entre as motivações e os benefícios amplamente investigada por vários autores. De uma forma simples, quando as empresas procuram a certificação com base em motivações internas, vão alcançar benefícios internos, isto é, benefícios relacionados com a melhoria interna da organização. Por outro lado, quando ocorre por motivações externas vão alcançar benefícios externos, ou seja, benefícios relacionados com a satisfação do cliente e com a publicidade ou exposição da empresa perante terceiros (Casadesús et al., 2001; Heras et al., 2001; Corbett et al., 2003; Bhuiyan e

Alam, 2005; Prajogo, 2008; Sampaio et al., 2009). Na tabela 2.4 é apresentado um resumo, dos principais benefícios internos e externos, da certificação, com base na revisão da literatura.

No entanto, no processo de certificação da ISO 9001 podem também surgir dificuldades ou barreiras. Dick (2000), no seu estudo sobre o desempenho das organizações certificadas pela ISO 9001, apurou que a implementação da norma obriga a vários documentos, que as organizações se preocupam demasiado em documentar o sistema em vez de verificarem se está a funcionar corretamente.

Bhuiyan e Alam (2005) apontam como dificuldades na certificação da ISO 9001, as restrições nos recursos, a subestimação nos esforços necessários para a certificação, o desenvolvimento de conjuntos de procedimentos e os custos elevados de preparação.

Tabela 2.4 - Principais benefícios internos e externos na certificação da ISO 9001.

Benefícios Internos	Benefícios Externos
Melhoria organizacional interna	Aumento das vendas
Aumento da produtividade	Melhoria da imagem da empresa
Clarificação de responsabilidades e funções	Ferramenta de marketing
Motivação dos colaboradores	Acesso a novos mercados
Melhoria na comunicação interna	Aumento da quota de mercado
Melhorias na qualidade dos produtos	Sustentação/melhoria da cotação das ações da empresa em bolsa
Vantagens competitivas	Aumento da satisfação e/ou confiança dos clientes
Diminuição do trabalho redundante	Melhoria da relação com os clientes
Diminuição das não conformidades	Redução do número de reclamações
Diminuição da percentagem de produtos não conformes	Aumento de compras repetidas
Aumento da rotação de <i>stocks</i>	
Melhoria do tempo de entrega/execução de serviço	
Melhor conhecimento do conceito da gestão da qualidade	
Identificação mais rápida de problemas e erros na empresa	
Melhor controlo da gestão e da informação na organização	

(Adaptado de: Beirão e Cabral, 2002, Buttle, 1997, Magd, 2006, Huarng *et al.*, 1999, Casadesús e Castro, 2005, Casadesús e Karapetrovic, 2005a)

As dificuldades na implementação da norma podem incluir o processo de não conformidades, o de controlo de registos, o de auditorias internas, o de compras e o processo de proteção de produtos (Bhuiyan e Alam, 2005). A tabela 2.5 apresenta, em síntese, as dificuldades mais importantes verificadas na certificação pela ISO 9001.

Tabela 2.5 - Principais dificuldades na certificação ISO 9001.

Norma	Dificuldades na implementação
ISO 9001:2008	Excesso de documentação
	Aumento dos custos
	Aumento do custo da gestão da qualidade
	Resistência à mudança
	Ferramentas e linguagem da qualidade
	Adaptação à norma na fase inicial
	Falta de tempo
	Falta de recursos humanos e materiais
	Falta de envolvimento da gestão de topo

(Adaptado de: Dick (2000), Bhuiyan e Alam (2005), Sampaio et al., 2009)

Deste modo, pode concluir-se que, as principais dificuldades apontadas pelas empresas, na certificação da ISO 9001, são o aumento de custos da gestão da qualidade, a resistência à mudança, as ferramentas e linguagem da qualidade, a adaptação à norma na fase inicial de implementação e certificação, a falta de tempo dos colaboradores, a falta de recursos humanos e materiais, e a falta de envolvimento da gestão de topo.

A opção pela certificação tem custos, que serão compensados por uma redução sensível dos custos da não qualidade. As despesas inerentes à implementação de um Sistema de Garantia da Qualidade dependem do estado em que se encontra a empresa nesta matéria, bem como do sector de atividade em que se posiciona, distribuindo-se por itens como: sensibilização e formação do pessoal, reformulação e redação de novos procedimentos, elaboração do manual da qualidade, tempo despendido pelos diretores das empresas e pelos seus colaboradores na preparação do respetivo dossier, entre outros. Os custos da certificação são, por vezes, apoiados por programas de financiamento (IAPMEI).

2.2.5. O Processo de Certificação

A certificação consiste em demonstrar que a empresa segue um determinado conjunto de normas, definidas a nível nacional e internacional, que visam proporcionar maiores níveis de qualidade e confiança a todos os interessados (clientes, trabalhadores, sócios/acionistas, etc.) e otimizar os processos, potenciando a redução de custos.

No mercado português, atuam vários organismos de certificação, os quais possuem, as suas próprias especificidades ao nível da condução dos seus processos de trabalho, sendo que terão que ser acreditados.

Genericamente, qualquer processo de certificação inicia-se pela receção de uma candidatura na entidade certificadora, a qual é inicialmente analisada e, se tudo estiver conforme com o definido, é programada uma primeira avaliação do sistema da qualidade. Vulgarmente trata-se de uma revisão da documentação e da realização da auditoria inicial, ou de concessão. Daqui resulta quase sempre a necessidade da empresa auditada desenvolver um plano de ações no sentido de corrigir as não conformidades (desvios) encontradas, durante a auditoria, face ao referencial normativo. Após, ultrapassados os eventuais desvios é emitido então um certificado.

Os certificados têm geralmente uma validade de três anos. Cumprida a entidade certificadora, durante esse intervalo de tempo, efetuar periodicamente auditorias para verificar se o sistema da qualidade certificado continua implementado e em funcionamento. Estas auditorias são, habitualmente, designadas por auditorias de acompanhamento (nalguns casos, de seguimento), podendo estas ter uma periodicidade semestral ou anual, conforme o tipo de metodologias instituídas pela entidade certificadora em causa.

Antes do termo de caducidade do certificado, é de novo efetuada uma auditoria global, auditoria de renovação, a toda a organização, com características semelhantes à auditoria de concessão, tendo em vista a reemissão do certificado. O certificado renovado é de novo emitido por um período de três anos e o processo repete-se por mais um ciclo de certificação e assim sucessivamente (Madeira et al., 2009). Este conjunto de auditorias (Figura 2.6) é o que normalmente se designa por **ciclo de certificação**.

As auditorias de certificação, sejam de concessão ou posteriores, devem ser sempre encaradas como um contributo para a melhoria do sistema de gestão.

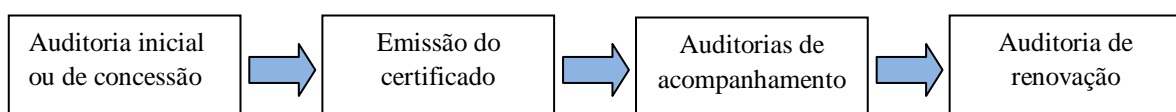


Figura 2.6 - Ciclo de Certificação (Adaptado de: Madeira et al., 2009).

2.3. A Acreditação

Muitas vezes, os termos certificação e acreditação são mal aplicados, pelo facto de se desconhecer o real significado dos mesmos. A certificação e a acreditação de sistemas de gestão são atividades que se diferenciam no que diz respeito aos objetivos e aos respetivos referenciais. Segundo a norma ISO 17000 referente à Avaliação da Conformidade – Vocabulário e Princípios Gerais, a certificação (de sistemas de gestão, de produtos, de pessoas) é uma das atividades de avaliação da conformidade. Por outro lado, a acreditação é um processo de avaliação e reconhecimento da competência técnica de acordo com normas internacionais para executar determinadas atividades – ensaios, calibrações, inspeções, certificações (Madeira et al., 2009).

A atividade de acreditação está sujeita a legislação comunitária que obriga a um funcionamento harmonizado, verificado através de um sistema de avaliação pelos pares.

Em consequência, cada Estado-Membro da União Europeia (UE) designou um único organismo nacional de acreditação, tendo em Portugal (Figura 2.7) essa missão sido atribuída ao IPAC, conforme estabelecido na sua lei orgânica (Decreto-Lei n.º 81/2012, de 27 de Março) e no Decreto-Lei n.º 23/2011 de 11 de Fevereiro.

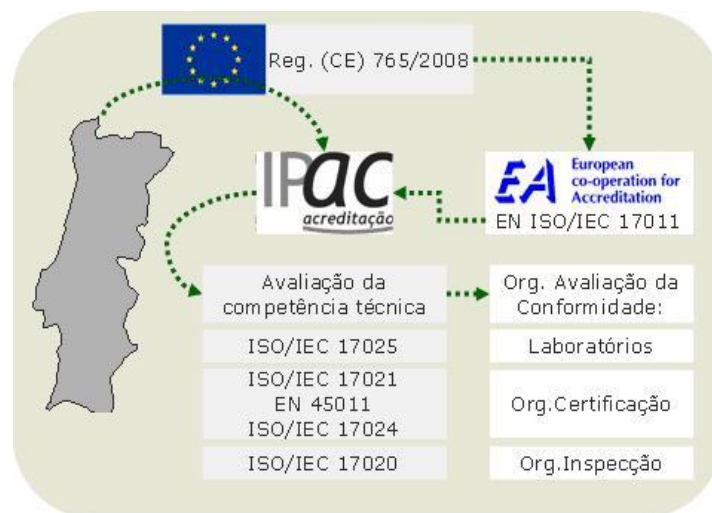


Figura 2.7 - Avaliação da competência técnica.
(Adaptado de: IPAC)

2.3.1. Instituto Português de Acreditação (IPAC)

O IPAC é o organismo nacional de acreditação requerido pelo Regulamento (CE) n.º 765/2008, que estabelece os requisitos de acreditação e fiscalização do mercado

relativos à comercialização de produtos e revoga o Regulamento (CEE) n.º 339/93. Tem por missão prestar serviços de acreditação, nomeadamente reconhecendo a competência técnica dos organismos de avaliação da conformidade atuantes no mercado. Atua assim, como agente regulador dos organismos de avaliação da conformidade, como laboratórios de ensaio e calibração, organismos de inspeção e de certificação (IPAC).

Além disso, o IPAC é membro da infraestrutura europeia de acreditação, a *European Cooperation for Accreditation* (EA), bem como das estruturas mundiais de acreditação, a *International Laboratory Accreditation Cooperation* (ILAC) e o *International Accreditation Forum* (IAF).

Para o desenvolvimento das suas atividades de acreditação o IPAC possui diversas comissões técnicas em que interatua com as partes interessadas e recorre a uma bolsa de avaliadores e peritos externos. Possui ainda uma Comissão Consultiva, representativa das várias partes interessadas na atividade de acreditação e que supervisiona a imparcialidade da sua atuação, bem como providencia orientação estratégica.

2.3.2. Processo de Acreditação

De acordo com o IPAC, o processo de acreditação é regido por normas internacionais, de modo a permitir a existência de Acordos de Reconhecimento Internacionais e o cumprimento do Regulamento (CE) 765/2008. O processo de acreditação (Figura 2.8), começa pela apresentação de uma candidatura pela entidade a acreditar, devendo para tal preencher e enviar para o IPAC os formulários correspondentes à atividade técnica que pretende desempenhar, seguidamente a candidatura é analisada pelo IPAC para verificar se o processo está completo e se pode ser dada sequência. Durante a fase de avaliação o IPAC nomeia uma Equipa Avaliadora, que estudará a documentação e procederá à respetiva avaliação. Terminada a avaliação é emitido um Relatório, identificando as deficiências que deverão ser corrigidas para demonstrar o cumprimento das normas de acreditação. A Entidade irá responder, a Equipa Avaliadora estuda e emite um parecer, a que se segue uma análise de todo o processo pelo IPAC. É então tomada uma decisão pelo IPAC, que sendo favorável, irá desencadear o ciclo anual seguinte.

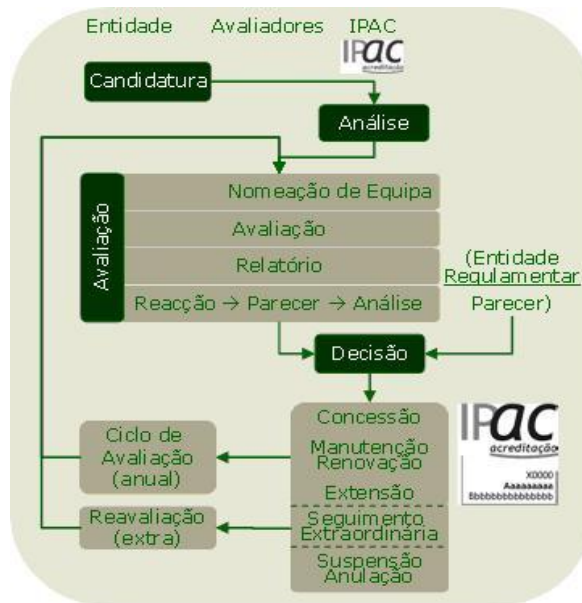


Figura 2.8 - Etapas do processo de Acreditação pelo IPAC.
(Adaptado de: IPAC)

2.3.3. Certificado de Acreditação

Para a identificação de uma Entidade Acreditada, o IPAC emite um **Certificado de Acreditação** com um **Anexo Técnico**, conforme a figura 2.9, onde são descritas as atividades acreditadas (que podem ou não coincidir com todas as atividades que a Entidade realiza). Cada Certificado de Acreditação tem um número de registo inequívoco (Xnnnn), que é repetido no correspondente símbolo de acreditação (IPAC).



Figura 2.9 - Certificado de Acreditação e Anexo Técnico.
(Adaptado de: IPAC)

Dado que a acreditação é específica (e não generalista como a certificação do sistema de gestão) para dar mais confiança no desempenho específico de cada atividade, o Anexo

Técnico, como já referido, descreve individualmente quais os ensaios, calibrações, exames, certificações e inspeções abrangidas. Foi desenvolvido um sistema de Anexos Técnicos Eletrónicos (Figura 2.10) com assinatura eletrónica qualificada que permite o seu uso como comprovativo legal, tendo sido inserido um código que permite comprovar a validade do Anexo.



Figura 2.10 - Anexo Técnico Eletrónico.
(Adaptado de: IPAC)

As entidades acreditadas são autorizadas a exibir os símbolos de Acreditação, de acordo com o respetivo Regulamento dos Símbolos de Acreditação.

A utilização dos símbolos de Acreditação (Figura 2.11), é obrigatória nos documentos resultantes das atividades acreditadas (ex. relatórios e certificados) e facultativas noutros documentos associados à realização das mesmas (ex. orçamentos, faturas, brochuras). A identificação de qualquer atividade não-acreditada é obrigatória em documentos com o Símbolo. Os símbolos têm uma referência textual diferente, dependendo do tipo de atividade acreditada (ex. ensaios, certificação), e identificam através do número de registo (Xnnnn) o correspondente Certificado de Acreditação e Anexo Técnico.



Figura 2.11 - Símbolos de Acreditação.
(Adaptado de: IPAC)

O IPAC possui um elevado reconhecimento a nível internacional uma vez que estabelece Acordos de Reconhecimento com o ILAC e o IAF. Esse reconhecimento permite-lhe disponibilizar símbolos conjugados (Figura 2.12) que podem ser usados em substituição dos símbolos de acreditação referidos anteriormente. Estes símbolos potenciam a competitividade das Entidades Acreditadas e estão juridicamente registrados pelo IPAC, sendo que qualquer uso indevido ou abusivo é passível de ser sancionado por lei.

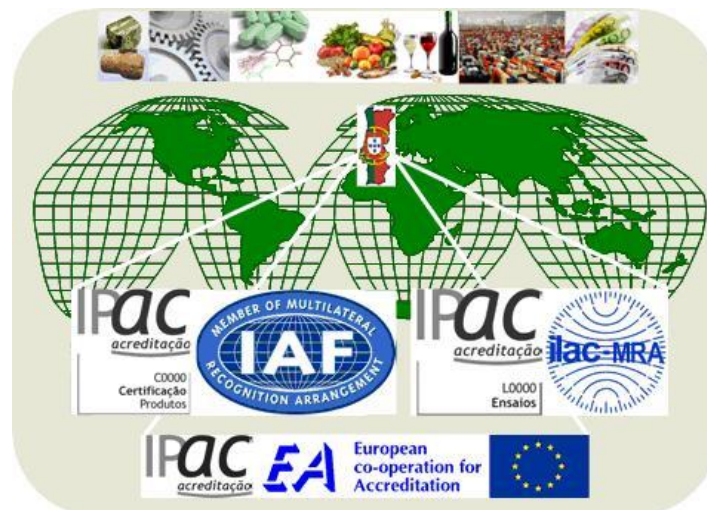


Figura 2.12 - Símbolos internacionais conjugados.
(Adaptado de: IPAC)

2.3.4. Vantagens e Dificuldades da Acreditação

Ainda que implicitamente as vantagens associadas à acreditação já tenham sido referidas, vamos sistematizá-las e dar-lhes alguma evidência. As vantagens podem ser de ordem organizacional, técnicas, éticas e ainda de mercado (Almeida e Pires, 2006).

As vantagens organizacionais dizem respeito à imposição de uma certa disciplina no trabalho de gestão e a uma constante revisão do Sistema da Qualidade (SQ). No fundo, tornam a organização mais sustentável, aumentam a segurança dos colaboradores e também a confiança de potenciais clientes.

As vantagens técnicas não se prendem só com a disciplina de trabalho a nível técnico, estão também associadas a uma maior garantia de que se dispõe de pessoal competente, instalações e equipamentos adequados e a uma maior garantia de que se recorre a métodos convenientemente validados para realizar os seus ensaios e/ou calibrações, a uma constante revisão dos procedimentos operacionais e, sem dúvida, à capacidade de evidenciar a qualidade dos resultados, documentando todo o trabalho operacional.

Já as vantagens éticas são bastante subtis e, por isso, são tão poucas vezes referidas. Fala-se em vantagens éticas porque esta forma de trabalhar proporciona critérios de decisão que permitem uma certa imparcialidade no processo de obtenção de resultados e oferece garantia de confidencialidade dos resultados.

As vantagens de mercado são muitas vezes apontadas como aquelas que as organizações mais ambicionam, mas que mais não são do que um reflexo perante as vantagens anteriores e muitas vezes também uma imposição do próprio mercado. Estas vantagens estão associadas a uma imagem de qualidade que o laboratório transmite e à capacidade que o laboratório passa a ter para responder a um mercado mais exigente.

No revés das vantagens existem as dificuldades. O recurso ao termo *dificuldades* ao invés de *desvantagens* tem a ver com o facto de estas serem condição necessária para cumprir o processo de acreditação. Não se tratam por isso de desvantagens mas antes de dificuldades, reflexo de um nível de exigência mais elevado.

Associado à implementação de um SQ podemos apontar um conjunto de três dificuldades genéricas que são comuns aos vários tipos de laboratórios e independentes da área de atividade destes. Estamos a pensar no *esforço financeiro*, que é

habitualmente a primeira dificuldade com que um laboratório toma contacto logo que inicia o processo de implementação do SQ, também do *volume documental*, que é uma das bases estruturais do SQ e que apesar de poder ser otimizado não pode ser evitado e, sem dúvida, a rotina de trabalho mais exigente que um SQ deste género impõe.

Um laboratório para implementar e manter um SQ ao nível da acreditação tem normalmente de assumir um maior esforço financeiro. Esse esforço financeiro está relacionado com recurso a pessoal de qualificação adequada, planos de formação contínua, auditorias (quer internas, quer externas), ensaios interlaboratoriais, instalações, controlo ambiental, recurso a materiais certificados, padrões de controlo, duplicados e outras formas de controlo da qualidade.

Relativamente à documentação, ela é uma parte indispensável do SQ, tratando-se do reflexo rigoroso da atividade do laboratório.

No sentido de cumprir criteriosamente a norma de referência, os laboratórios menos experimentados na área da acreditação tendem a produzir um excesso de documentação que, em alguns casos, se traduz num enorme atrito ao funcionamento do próprio laboratório. Apesar de com a prática o volume de documentação poder (e dever) ser contraído, ele não poderá ser ultrapassado, tratando-se do mecanismo que por excelência permite evidenciar o SQ.

Uma outra dificuldade implícita, mas raramente apontada, é a rotina de trabalho mais exigente que um SQ impõe. A implementação de um SQ pressupõe um conjunto de operações que têm como objetivo principal demonstrar que o laboratório gera resultados adequados à qualidade exigida, sem grandes flutuações e garantir que, se existir uma falha, ela será prontamente detetada. Para um laboratório cumprir estes objetivos terá de realizar todo um conjunto de operações que permita recolher dados para o controlo da qualidade. Entre essas operações encontram-se: a utilização de padrões de controlo e materiais de referência, a validação de métodos, os ensaios replicados, as verificações e calibrações periódicas de equipamentos, a monitorização de parâmetros que possam ter significado no resultado final, entre outros. Além de todos os procedimentos técnicos da qualidade, existem uma série de outros procedimentos que aumentam a exigência de trabalho diário, tais como: o registo documental, a formação contínua do pessoal, etc.

2.3.5. Acreditação *versus* Certificação de Laboratórios

Apesar da acreditação se diferenciar da certificação em vários aspetos, como por exemplo nos critérios e metodologias usadas, um laboratório pode ser simultaneamente certificado e acreditado. Assim, um laboratório de análises, por exemplo, pode ser certificado pela NP EN ISO 9001 e acreditado pela NP EN ISO/IEC 17025, constituindo assim um sistema de gestão da qualidade que aliado à competência técnica, garante que a entidade dispõe de pessoal competente, instalações e equipamentos adequados e usa métodos normalizados e/ou devidamente validados.

Segundo Madeira et al. (2009), se um laboratório possuir a certificação do seu sistema de gestão, segundo o referencial ISO 9001, atesta que a calibração ou ensaio são realizados de acordo com procedimentos escritos e fundamentados que garantem os requisitos do referencial em causa. Quando acreditado segundo a norma ISO 17025, vai além da execução da calibração de acordo com um procedimento escrito, pois passa a ser necessária a confirmação da competência técnica de quem executa a respetiva calibração.

3 - Acreditação pela NP EN ISO/IEC 17025

3.1. Introdução à Norma

Em 2005 foi publicada a segunda edição do referencial NP EN ISO/IEC 17025, o qual possui os requisitos gerais a que um laboratório deve obedecer para ser acreditado.

Esta nova edição é sinónimo de compromisso da gestão na melhoria contínua do sistema de gestão global, quer na sua componente de gestão e organização, quer na componente técnica, bem como de comunicação como forma de interação com o sistema de gestão, dentro do laboratório e na relação com os clientes.

Os laboratórios de ensaio e calibração que estiverem conformes com norma ISO 17025 funcionarão igualmente de acordo com a norma ISO 9001. No entanto, tal como foi referido num dos pontos anteriores, a conformidade do SGQ de um laboratório com os requisitos da ISO 9001 não demonstra, por si só, a competência do laboratório para produzir dados e resultados tecnicamente válidos, nem a conformidade demonstrada com a norma ISO 17025 implica a conformidade do SGQ do laboratório com todos os requisitos da ISO 9001.

Segundo dados do IPAC (2013), existem em Portugal cerca de 513 laboratórios acreditados pela norma ISO 17025, sendo que destes, 59 referem-se a laboratórios de calibração e 454 a laboratórios de ensaios, nos quais estão incluídos os laboratórios de análises de águas, cujo número corresponde a 104 (IPAC).

De acordo com o referencial ISO 17025, o campo de aplicação pode ser facilmente resumido nos seguintes pontos:

- ✓ Especifica os requisitos gerais de competência para realizar ensaios e/ou calibrações, incluindo amostragem, abrangendo os ensaios e as calibrações realizados segundo métodos normalizados, métodos não normalizados e métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório;
- ✓ É aplicável a todas as entidades que efetuem ensaios e/ou calibrações, tais como laboratórios de primeira, segunda ou terceira parte e ainda laboratórios nos quais

os ensaios e/ou calibrações façam parte integrante da inspeção e da certificação de produtos;

- ✓ É aplicável a todos os laboratórios, independentemente do número de pessoas ou da extensão do âmbito das atividades de ensaio e/ou calibração;
- ✓ Sempre que um laboratório não realize uma ou mais das atividades abrangidas pela ISO 17025, como amostragem e concepção/desenvolvimento de novos métodos, os requisitos descritos nas correspondentes secções não se lhes aplicam;
- ✓ Destina-se a ser utilizada pelos laboratórios no desenvolvimento dos seus SGQ e para as atividades administrativas e técnicas;
- ✓ Os clientes dos laboratórios, as entidades regulamentadoras e os organismos de acreditação, também poderão utilizá-la para confirmar ou reconhecer a competência dos laboratórios.

Tendo em conta que os requisitos de gestão da ISO 17025 são muito semelhantes aos do referencial ISO 9001, será pois dada ênfase à Secção 5 – Requisitos Técnicos.

3.2. Requisitos Técnicos da Norma

A acreditação de laboratórios assenta na contínua conformidade com os requisitos e na verificação de que o seu padrão de operação está continuamente a ser mantido, garantindo que os dados obtidos são precisos e confiáveis.

De acordo com a norma, a competência técnica depende de vários fatores que por sua vez afetam a produção de dados de ensaio ou calibração. Assim, os fatores pertinentes à competência técnica do laboratório incluem: competência técnica do pessoal; validade e adequação dos métodos de ensaio; rastreabilidade de medições e calibrações a normas nacionais; adequação, calibração e manutenção dos equipamentos de ensaio; ambiente de ensaio; amostragem, manuseio e transporte de itens de ensaio e garantia da qualidade de dados de ensaios e calibrações (Tabela 3.1).

Todos estes requisitos deverão ser cumpridos pelo laboratório que pretenda ser acreditado pelo IPAC, segundo o referencial em causa.

Tabela 3.1 - Requisitos Técnicos Essenciais de acordo com a ISO 17025.

Subsecção da norma	Requisitos técnicos
5.1	Generalidades
5.2	Pessoal
5.3	Instalações e condições ambientais
5.4	Métodos de ensaio e calibração e validação de métodos
5.5	Equipamento
5.6	Rastreabilidade das medições
5.7	Amostragem
5.8	Manuseamento dos itens a ensaiar ou calibrar
5.9	Garantia da qualidade dos resultados de ensaio e de calibração
5.10	Apresentação dos resultados

(Adaptado de: NP EN ISO/IEC 17025)

Todos os laboratórios devem ter em conta estes fatores aquando do desenvolvimento de métodos e procedimentos de ensaios e/ou calibrações, na formação e qualificação do pessoal e na seleção e calibração dos equipamentos utilizados para efetuar os ensaios e/ou calibrações.

Subsecção 5.2 – Pessoal

Neste requisito, o laboratório deve definir os objetivos no que se refere a habilitações escolares, formação e garantia da competência do pessoal. Cada laboratório deve definir uma política e procedimentos para identificação das necessidades de formação e proporcionar formação ao pessoal. No fim de cada ação de formação, devem avaliar a eficácia das mesmas.

Devem estar definidos os requisitos mínimos de qualificação por função ou posto de trabalho. Por exemplo, o Responsável Técnico (RT) deve ter experiência profissional adequada e suficiente na respetiva área técnica para o desempenho da função e recomenda-se que possua licenciatura ou bacharelato nas áreas de atividade técnica do laboratório (Guia IPAC-17025).

A descrição e atualização de funções deve ser implementada, podendo ser feita diretamente, identificando pessoalmente os funcionários em causa, ou indiretamente,

identificando os cargos/postos de trabalho. Além disso, devem estar definidas responsabilidades, individuais ou por função, incluindo:

- ✓ Implementação/validação de métodos;
- ✓ Utilização de equipamentos para realização de ensaios;
- ✓ Amostragem;
- ✓ Avaliação de resultados;
- ✓ Elaboração e aprovação de boletins.

Não esquecer que devem ser mantidos registos das autorizações, competência, habilitações escolares e qualificação profissional, formação, perícia e experiência relevantes de todo o pessoal técnico, incluindo pessoal contratado.

Subsecção 5.3 – Instalações e Condições Ambientais

As instalações devem ser adequadas para a correta realização dos ensaios e devem estar documentados os requisitos técnicos relativos às instalações e às condições ambientais que possam afetar os resultados. Nomeadamente quando necessário, podem existir dispositivos para controlar e monitorizar as condições ambientais.

Os tipos de instalações consideradas pela norma, incluem: instalações permanentes (usadas por períodos de tempo superiores a três anos), instalações temporárias (instalações utilizadas por um período de tempo inferior a três anos), instalações móveis (normalmente localizadas em meios de transporte ou transportáveis) e instalações do cliente ou definidas pelo cliente (ensaios/calibrações no local). No entanto, para serem abrangidas pela acreditação, é necessário existir uma instalação permanente (Guia IPAC-17025).

As condições para a execução de ensaios fora das instalações permanentes necessitam estar definidas. O laboratório deve monitorizar, controlar e registar as condições ambientais, quando necessário, e os ensaios e calibrações devem ser suspensos quando as condições ambientais possam comprometer os respetivos resultados.

O acesso às áreas de ensaios e calibrações deve ser controlado e devidamente assinalado. Além disso, deverá existir uma separação das áreas onde se realizam atividades incompatíveis, como a aplicação do princípio de "marcha em frente" na microbiologia.

A manutenção, a higiene e limpeza das instalações deverá ser assegurada e, sempre que necessário, devem ser estabelecidos procedimentos especiais para a realização das mesmas, nomeadamente a salvaguarda da operacionalidade dos equipamentos e a integridade dos itens ensaiados.

Subsecção 5.4 – Métodos de Ensaio e Calibração e Validação de Métodos

O laboratório deve comprovar que utiliza métodos e procedimentos adequados para a realização de todos os ensaios e/ou calibrações dentro do seu âmbito de atividade e possuir instruções sobre a utilização e o funcionamento de todo o equipamento relevante para a realização das respetivas atividades.

Deverão existir, no laboratório, instruções sobre o manuseamento e a preparação dos itens a ensaiar e/ou calibrar.

Toda a documentação deve estar atualizada e acessível ao pessoal.

Na seleção dos métodos, o laboratório deve utilizar os que satisfaçam as necessidades dos clientes e informá-los dos métodos utilizados ou escolhidos. Relativamente às normas de ensaio/calibração, sempre que aplicável, o laboratório deverá utilizar a edição em vigor das mesmas.

Sempre que o laboratório considere o método proposto pelo cliente, inadequado ou desatualizado, caso não exista normas de ensaio/calibração, deve informar o mesmo desse facto.

A conceção de métodos pelo laboratório deve ser planeada e atribuída a pessoal qualificado. Os planos de desenvolvimento dos métodos devem ser atualizados à medida que se efetua a melhoria dos métodos e deve ser assegurada uma comunicação efetiva entre todo o pessoal envolvido.

A utilização de métodos não normalizados ou internos deve ser objeto de acordo com o cliente, sendo claros os requisitos e objetivos do ensaio/calibração. Deverão existir procedimentos para todos os métodos desenvolvidos.

Relativamente à validação de métodos, o laboratório deve validar todos os métodos, ou seja:

- ✓ Métodos não normalizados;
- ✓ Métodos concebidos ou desenvolvidos pelo próprio laboratório;
- ✓ Métodos normalizados utilizados fora do âmbito da utilização previsto;
- ✓ Extensões ou modificações de métodos normalizados.

O laboratório deve registar os resultados obtidos, o procedimento utilizado e uma declaração quanto à adequação do método.

O facto de se realizar um ensaio/calibração de acordo com um método normalizado não dispensa a evidência de registos que demonstrem a sua implementação em cumprimento com as características de desempenho do mesmo.

Para validar métodos pode ser necessário e conveniente utilizar alguns (ou todos) os métodos abaixo descritos.

- ✓ **Avaliação indireta**, por evidência das suas características:
 - Estudo da representatividade do método, ou seja, que as características determinadas correspondem ao objetivo do ensaio/calibração;
 - Estudo dos fundamentos teóricos do método para evidenciar a base científica;
 - Estudo de interferências e fontes de erro para delinear a sua aplicabilidade e dominar a sua execução;
 - Estudo de parâmetros característicos do método (exemplo exatidão, repetibilidade, reprodutibilidade, incerteza, etc.);

- ✓ **Avaliação direta**, por comparação com referências aceites:
 - Comparação com métodos normalizados ou de referência;
 - Comparação com padrões ou materiais de referência certificados;
 - Comparações interlaboratoriais.

Um laboratório de ensaios/calibrações deve ter e aplicar um procedimento para estimar a incerteza de medição de todos os ensaios executados e de todas as calibrações efetuadas.

Os laboratórios devem ter e aplicar procedimentos para estimar a incerteza de medição ou apresentar estudos nessa área, de acordo com o documento EA-4/02 *Expression of the Uncertainty of Measurement in Calibration*.

Para a estimativa da incerteza de medição, devem ser tidas em conta todas as componentes da incerteza que tenham importância em cada situação utilizando-se métodos de análise adequados. Algumas das componentes que podem contribuir para a incerteza final de medição, têm a ver com os padrões de referência e materiais de referência utilizados, métodos e equipamento utilizado, condições ambientais aquando da realização da medição e características técnicas do item a ensaiar ou calibrar.

O laboratório deve possuir um sistema de controlo de dados e proceder sistematicamente a verificações das transcrições que efetua e dos resultados que emite.

Sempre que sejam utilizados computadores ou equipamentos automatizados, o laboratório deve garantir que o *software* está suficientemente documentado e validado como apto ao uso. Terão de estar estabelecidos e implementados procedimentos para proteção de dados que garantam a integridade dos mesmos.

Subsecção 5.5 – Equipamento

Para que o laboratório possa efetuar as melhores medições e garantir aos seus clientes os resultados mais fiáveis, este requisito é um dos mais importantes. Assim, o laboratório deve dispor do equipamento adequado à correta realização dos ensaios e/ou calibrações. Caso recorra a equipamentos externos ao laboratório (por exemplo caso de avaria ou

acidente), este tem de garantir o cumprimento dos requisitos e características técnicas dos mesmos.

Devem ser estabelecidos programas de calibração para as principais grandezas ou valores dos instrumentos, sempre que exista impacto significativo sobre os resultados, quando requerida nomeadamente nas normas ou especificações de ensaio/calibração. Cada equipamento deve ser calibrado e/ou verificado antes da sua utilização, ser identificado (cada item do equipamento e respetivo *software*) e o seu uso restringido apenas a pessoal qualificado e autorizado.

Devem ser mantidos registos relativos a cada item do equipamento e *software* que incluam, pelo menos:

- ✓ A identificação;
- ✓ O nome do fabricante, a identificação do modelo e o número de série;
- ✓ As verificações de que o equipamento cumpre as especificações;
- ✓ A localização habitual;
- ✓ As instruções do fabricante sobre a utilização e manutenção ou a indicação da sua localização;
- ✓ As datas, os resultados e as cópias dos relatórios e certificados de todas as calibrações, ajustes, critérios de aceitação e data prevista da próxima calibração;
- ✓ O plano de manutenção, se apropriado, e as manutenções efetuadas até à data;
- ✓ Quaisquer danos, avarias, modificações ou reparações no equipamento.

Caso um equipamento tenha uma avaria ou apresente resultados suspeitos deve ser colocado fora de serviço, sendo claramente isolado e identificado como tal e o laboratório deve examinar os efeitos da deficiência, sobre anteriores ensaios e/ou calibrações e, caso seja necessário, desencadear o procedimento *Controlo do trabalho não conforme* (este procedimento deverá ser definido nos requisitos de gestão).

A manutenção pode ser feita pelo laboratório ou por entidade externa, podendo ser usadas as instruções do fabricante ou elaborar procedimentos específicos, caso não existam ou sejam insuficientes. A metodologia de manutenção deve contemplar, pelo menos, os seguintes pontos:

- ✓ registo do histórico das manutenções;
- ✓ determinação dos efeitos em calibrações ou ensaios anteriores;
- ✓ modo de identificação do seu estado operacional, inclusive quando fora de serviço;
- ✓ localização do equipamento enquanto permanecer em manutenção ou fora de serviço.

Relativamente aos equipamentos sob controlo do laboratório que necessitem de calibração, devem ser etiquetados ou codificados para indicar o estado de calibração, incluindo a data de última calibração e a data da próxima calibração ou os critérios que a estabelecem. O laboratório deve possuir procedimentos para controlos intermédios dos equipamentos.

Todo o equipamento de ensaio e/ou calibração, incluindo *hardware* e *software*, deve ser protegido contra ajustes involuntários, que possam invalidar os resultados. Quando as calibrações derem origem a um conjunto de fatores de correção, devem existir procedimentos que garantam que as cópias (por exemplo, em *software*) sejam corretamente atualizadas.

Subsecção 5.6 – Rastreabilidade das Medições

Segundo o VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2008) a rastreabilidade metrológica é a *propriedade de um resultado de medição através da qual o resultado pode ser relacionado a uma referência por intermédio de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição*. Segundo o mesmo documento, cadeia de rastreabilidade metrológica é uma *sequência de padrões e calibrações que é usada para relacionar um resultado de medição a uma referência*, conforme a figura 3.1.



Figura 3.1 - Cadeia de Rastreabilidade Metrológica.
(Adaptado de: Barradas e Sampaio, 2011)

Num laboratório, todo o equipamento utilizado para ensaios e/ou calibrações, antes de entrar ao serviço, deve ser calibrado, incluindo, como referido, equipamento que tenha impacto significativo sobre a exatidão ou a validade do resultado do ensaio, da calibração ou da amostragem e aquele cuja calibração seja requerida, nomeadamente nas normas ou especificações de ensaio/calibração.

As calibrações podem ser efetuadas externamente ao laboratório (calibração externa), por laboratórios de calibração acreditados ou por Laboratórios Nacionais de Metrologia (LNM) ou Institutos Designados (ID), ou internamente no laboratório (calibração interna)

Deve existir um programa e procedimentos para realizar a calibração dos equipamentos. Convém que este programa inclua um sistema para a seleção, utilização, calibração, verificação, controlo e manutenção dos padrões, materiais de referência utilizados como padrões e equipamento de medição e ensaio utilizado para realizar ensaios e calibrações. O programa deve também ser concebido e gerido de modo a garantir que as calibrações e medições realizadas pelo laboratório sejam rastreáveis ao Sistema Internacional (SI) de unidades.

Existem áreas de ensaios em que a rastreabilidade ao SI é impossível ou irrelevante, como é geralmente o caso nas medições químicas e biológicas. Por outro lado, nas

medições físicas é normalmente expectável existir rastreabilidade ao SI (Guia IPAC - 17025).

A rastreabilidade às unidades SI pode ser feita por referência a um padrão primário adequado ou por referência a uma constante natural, cujo valor, em termos da unidade SI, relevante seja conhecido e recomendado.

Quando não é possível efetuar calibrações e/ou ensaios nas unidades SI, devem ser utilizados materiais de referência certificados ou métodos especificados e/ou padrões consensuais claramente descritos e acordados por todas as partes interessadas.

Sempre que possível, é exigida a participação num programa adequado de comparações interlaboratoriais.

Relativamente aos padrões e materiais de referência, o laboratório deve ter um programa de procedimentos implementado. Os padrões de referência (PR) devem ser calibrados por um organismo que possa evidenciar a rastreabilidade, antes e depois de cada ajuste. Por outro lado, devem ser utilizados apenas para calibrações, exceto quando outras atividades invalidam o seu desempenho.

Por seu lado, os materiais de referência (MR) devem, sempre que possível, ser rastreáveis às unidades SI ou a MR certificados. Os MR internos devem ser verificados na medida em que tal seja técnica e economicamente praticável. Os materiais de referência são uma ferramenta extremamente importante para avaliar a qualidade dos resultados obtidos e podem ser usados na validação de métodos, calibração, estimativa de incertezas de medição, treino de colaboradores e controlo da qualidade.

Devem também existir procedimentos para efetuar em segurança o manuseamento, transporte, armazenamento e utilização de PR e MR, a fim de evitar a sua contaminação ou deterioração e proteger a sua integridade.

Subsecção 5.7 – Amostragem

No âmbito da norma, amostragem não é a preparação da amostra ou item recebido para ensaio/calibração, mas sim a sua recolha de forma representativa e pode abranger as atividades de conceção do plano de amostragem, recolha de amostras ou itens

(incluindo preservação e conservação, se aplicável) e seu transporte até ao laboratório que efetua a determinação.

Apenas serão auditados os requisitos associados a esta atividade se ela estiver especificamente incluída no âmbito da acreditação. Assim, o IPAC procederá à acreditação de acordo com o referencial NP EN ISO/IEC 17025 de entidades que realizem atividades de amostragem de forma isolada, sem realização dos subsequentes ensaios ou de entidades que realizem simultaneamente as atividades de amostragem e respetivos ensaios. Isto quer dizer em termos práticos que se o laboratório não poder possuir a amostragem acreditada, terá que subcontratar esta tarefa.

Considera-se como pré-requisito que se faça a colheita de amostras e se realize/assegure o transporte até ao laboratório que faz os ensaios.

As alterações aos procedimentos de amostragem solicitados pelo cliente devem ser registadas e incluídas nos relatórios e posteriormente comunicadas ao pessoal envolvido no processo de amostragem.

Devem existir, também, procedimentos para registos de amostragem, incluindo processo, local de amostragem, pessoal envolvido e condições ambientais.

Subsecção 5.8 – Manuseamento dos Itens a Ensaiar ou Calibrar

Para se efetuar um manuseamento correto dos itens a ensaiar ou calibrar, sem danificar ou alterar as suas características, o laboratório deve possuir procedimentos para transporte, receção, identificação, circulação, manuseamento, eliminação, proteção e destino das amostras ou equipamentos. Os procedimentos devem incluir condições de conservação/segregação quando necessário.

Deve existir um mecanismo para identificar inequivocamente as amostras ou equipamentos e esse mecanismo deve garantir o anonimato dos ensaios e ou calibrações face a terceiros.

Devem ser registados os desvios às condições normais, defeitos ou avarias na receção dos itens.

Os procedimentos, as instalações e as condições (ambientais ou materiais) de ensaio ou calibração devem ser adequados para evitar a deterioração ou perda das características dos itens durante o armazenamento, preparação e manuseamento.

Subsecção 5.9 – Garantia da Qualidade dos Resultados de Ensaio e de Calibração

O laboratório deve possuir procedimentos de controlo da qualidade para monitorizar e validar os ensaios ou calibrações e manter registos dos resultados desse controlo (Anexo A). A metodologia de Controlo da Qualidade (CQ) deve ser mais frequente e exaustiva em áreas em que não exista rastreabilidade ao SI, como por exemplo na química e biologia.

Deve utilizar os dados para deteção de tendências e aplicação de técnicas estatísticas, se viável. A deteção de tendências pode ser feita através de cartas de controlo ou participando num ensaio de aptidão ou comparação interlaboratorial. Além disso, para efetuar essa monitorização e validação, o laboratório pode realizar várias ações, não restritas, como as seguintes:

- ✓ Utilizar materiais de referência, certificados e/ou controlo da qualidade interno com recurso a materiais de referência secundários;
- ✓ Efetuar ensaios e/ou calibrações em replicado, utilizando os mesmos métodos ou métodos diferentes;

A participação em ensaios interlaboratoriais, permite avaliar se os resultados das medições são comparáveis quando estas são conduzidas por diferentes partes, em diferentes locais e em diferentes tempos.

Num ensaio interlaboratorial, participam dois ou mais laboratórios em que o seu âmbito de acreditação seja idêntico. Todos os participantes utilizam o mesmo equipamento ou material, para efetuar a calibração ou ensaio e posteriormente são analisados os resultados obtidos por um laboratório independente, designado por laboratório de referência. Os participantes são codificados, sabendo apenas o código atribuído ao seu laboratório, e é emitido um relatório com a avaliação da qualidade dos resultados obtidos pelos laboratórios participantes, a qual é efetuada através do cálculo do *erro normalizado* (En). Esse erro é calculado através da seguinte expressão:

$$En = \frac{|V_{lab} - V_{ref}|}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}}$$

sendo: V_{lab} – valor medido pelo laboratório participante; U_{lab} – incerteza associada ao V_{lab} ; V_{ref} – valor de referência; U_{ref} – incerteza associada ao V_{ref} .

Os resultados obtidos serão satisfatórios se o erro normalizado for igual ou inferior a 1, ou seja, $En \leq 1$.

Subsecção 5.10 – Apresentação dos Resultados

Aquando da criação e emissão dos relatórios ou certificados, os resultados devem ser corretamente apresentados do ponto de vista técnico e de uma forma clara e objetiva. O seu formato deve incluir cada tipo de ensaio ou calibração e minimizar a possibilidade de incompreensão ou uso incorreto dos mesmos.

Os relatórios ou certificados devem conter as seguintes informações:

- ✓ Um título (exemplo: “Relatório de ensaio” ou “Certificado de calibração”);
- ✓ O nome e a morada do laboratório, e o local onde foram realizados os ensaios ou calibrações;
- ✓ A identificação do relatório de ensaio ou certificado de calibração, paginação, e uma identificação clara do fim do mesmo (Anexo A1: Registo de calibração/Controlo)
- ✓ O nome e a morada do cliente;
- ✓ Identificação do método utilizado;
- ✓ A descrição, estado e identificação inequívoca do(s) item(ns) ensaiado(s) ou calibrado(s);
- ✓ A data de receção do(s) item(ns) para ensaio ou calibração, sempre que esta seja essencial para a validade e utilização dos resultados;
- ✓ A(s) data(s) da realização do ensaio ou calibração (Anexo A2: Plano Anual);

- ✓ Referência ao plano e aos procedimentos de amostragem utilizados pelo laboratório ou por outros organismos (quando relevante);
- ✓ Os resultados do ensaio ou calibração, incluindo quando apropriado as unidades de medição;
- ✓ O(s) nome(s), função(ões) e assinatura(s) ou identificação equivalente, da(s) pessoa(s) que autoriza(m) o relatório de ensaio ou certificado de calibração;
- ✓ Quando relevante, uma declaração em como os resultados se referem aos itens ensaiados ou calibrados.

Os ensaios ou calibrações fora do âmbito da acreditação do laboratório ou subcontratados devem ser devidamente assinalados. Sempre que o laboratório emita opiniões e pareceres, estas devem ser documentadas e assinaladas como tal. Caso o laboratório opte pela transmissão eletrónica dos relatórios ou certificados, deve cumprir com os requisitos de integridade e confidencialidade da informação. Todas as correções ou aditamentos aos relatórios ou certificados devem ser feitas em documento próprio, referenciando sempre o original que substitui. As incertezas apresentadas devem ser corretamente estimadas e justificadas. Um certificado de calibração (ou etiqueta de calibração) não deve incluir qualquer recomendação relativa ao intervalo de calibração, exceto se tal tiver sido acordado com o cliente.

3.3. Interação das Normas NP EN ISO 9001 e NP EN ISO /IEC 17025

Segundo Pizzolato et al. (2008), dependendo da atuação do laboratório e o modo com que a organização onde o mesmo se encontra inserido pretende satisfazer os pedidos dos clientes, a seleção do referencial de avaliação da conformidade do SGQ, pode ser apenas a certificação segundo a norma ISO 9001 ou a acreditação segundo a norma 17025. Ambas as atividades, a acreditação de laboratórios segundo os requisitos da ISO/IEC 17025 e a certificação ISO 9001, asseguram a existência de SGQ nas organizações, o que é aceite internacionalmente, nos dias de hoje, como evidência da credibilidade da gestão empresarial.

A norma ISO 17025, na sua introdução, refere que a grande evolução da utilização de sistemas de gestão conduziu à necessidade de garantir, por parte dos laboratórios que

fazem parte de organizações mais amplas, que o seu SGQ cumpre os requisitos da norma ISO 9001. Assim, a norma ISO 17025 inclui todos os requisitos da norma ISO 9001 relevantes para o serviço de calibração ou ensaio abrangidos pelo SGQ do laboratório em causa.

De acordo com a mesma norma, A conformidade do sistema de gestão da qualidade de um laboratório com os requisitos da ISO 9001 não demonstra, por si só, a competência do laboratório para produzir dados e resultados tecnicamente válidos. Nem a conformidade demonstrada com a presente Norma implica conformidade do sistema de gestão da qualidade do laboratório com todos os requisitos da ISO 9001.

Ou seja, um laboratório que seja acreditado pela ISO 17025 não garante, a nível nacional e internacional, ao seu cliente que a organização na qual ele se encontra inserido obedece a todos os requisitos da certificação ISO 9001, nomeadamente os que contêm os requisitos de realização de produtos e os requisitos de monitorização e avaliação dos processos.

Por sua vez, um laboratório que esteja inserido numa organização que possua toda a sua estrutura certificada na ISO 9001 não garante que o mesmo possua competência técnica adequada para avaliar a conformidade de determinados equipamentos, produtos ou mesmo serviços. Garante, sim, que a organização, e segundo Dick et al. (2002), se preocupa, sobretudo, com o que faz para assegurar a conformidade dos seus produtos ou serviços de acordo com os requisitos dos clientes.

Assim no que concerne à formalização da credibilidade laboratorial; o instrumento a ser adotado não deve ser a certificação ISO 9001 do Sistema da Qualidade do laboratório mas sim a sua acreditação, uma vez que este, além do Sistema da Qualidade, também atesta a competência do laboratório. Na figura 3.2 encontra-se representada a interação da ISO 9001 e da ISO 17025.

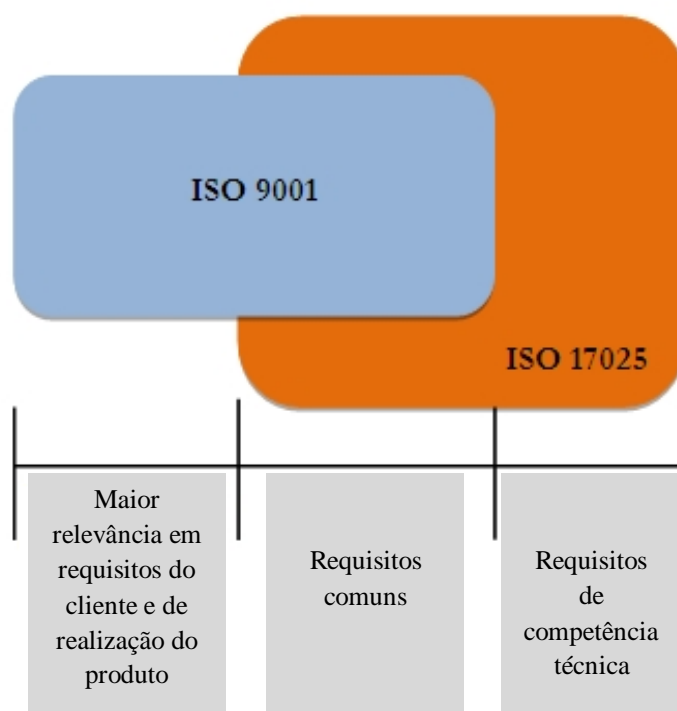


Figura 3.2 - Interação das normas ISO 9001 e ISO 17025
(Adaptado de: Barradas e Sampaio, 2011)

3.3.1. Sistemas de Gestão da Qualidade no Laboratório

Tal como referido, existem diferenças na finalidade, critérios e relevâncias quando selecionamos o referencial ISO 17025 ou ISO 9001 como padrão para o nosso SGQ. Para os laboratórios interessados em demonstrar competência técnica apoiados por um SGQ, o referencial adequado é a ISO 17025.

Por outro lado, laboratórios acreditados pela ISO 17025 podem ter motivos para também possuírem uma certificação ISO 9001 como, por exemplo, laboratórios que estejam inseridos em organizações que também realizam atividades, tais como marketing, consultadoria, formação e outras, podendo estas ter a necessidade ou desejo que tais atividades sejam reconhecidas através de um processo de certificação ISO 9001.

O objetivo de um SGQ para laboratório é gerir todos os itens que possam afetar a qualidade. Desta maneira, ele é realizado através da elaboração de procedimentos documentados (assinados e controlados) para que todas as etapas do trabalho sejam realizadas de forma adequada (com qualidade), sempre da mesma maneira. Este conjunto de documentos irá formar o SGQ do laboratório.

Como referido, existem diversas etapas para realização de um ensaio, que podem ser destacadas como itens e que podem afetar a qualidade, como por exemplo (Figura 3.3):

- ✓ Análise crítica de contrato (para conhecer e atender as necessidades do cliente);
- ✓ Amostragem (garantir a representatividade da amostra);
- ✓ Transporte da amostra (deve ser adequado para não degradar a amostra);
- ✓ Recepção da amostra e codificação (avaliar a condição da amostra na chegada ao laboratório e identificação adequada para que esta não seja confundida);
- ✓ Armazenagem da amostra e controle (armazenar em condições adequadas e controladas para não degradar a amostra);
- ✓ Validação de metodologia (utilizar metodologias adequadas);
- ✓ Preparação da amostra (também relacionada à etapa analítica e à amostragem dentro do laboratório, deve ser realizada de forma adequada);
- ✓ Realização do ensaio (análise da amostra em equipamentos calibrados);
- ✓ Cálculo da incerteza (visa apresentar o nível de confiança do resultado analítico, com a dispersão de valores que razoavelmente podem ser atribuídos ao resultado);
- ✓ Elaboração do relatório (apresentar os resultados com clareza ao cliente);
- ✓ Descarte de resíduos (descartar de forma adequada e informando ao cliente).



Figura 3.3 - Estrutura básica de procedimentos necessários para a elaboração de um SGQ para Laboratórios. (Adaptado de: Olivares, 2006).

Para o controle destes itens, é necessária a elaboração de diferentes procedimentos. Alguns deles são aplicados diretamente a determinado item (os quais podem ser chamados de procedimentos de funcionamento), outros são aplicados para o controle mais abrangente de diversos itens (os quais podem ser chamados de procedimentos de suporte). Apesar da figura 3.3 apresentar uma estrutura básica dos procedimentos necessários para a elaboração de um SGQ, ela pode ser utilizada como a “espinha dorsal” do sistema e, com a adição de apenas alguns requisitos adicionais, servirá para a implantação da ISO/IEC 17025.

Os procedimentos são responsáveis por padronizar as várias atividades do laboratório e, muitas vezes, podem gerar registos das atividades. Por exemplo, o procedimento de validação, que determina a sistemática de validação de metodologias, gera registos contendo os resultados da validação para determinada metodologia (como limites de detecção, recuperação, entre outros).

Devido ao grande número de procedimentos e registos gerados num SGQ, também é necessário elaborar um documento que apresente todos os procedimentos e suas inter-relações. Será este o documento principal deste sistema, pois apresentará toda a

estrutura de funcionamento do laboratório e corresponde ao Manual de Sistema da Qualidade (MSQ)

Para facilitar o entendimento sobre todos os documentos e registros gerados, podemos construir uma pirâmide de documentos e registros, na qual o topo apresenta o documento mais abrangente o MSQ, que define os documentos para o funcionamento das diversas atividades do laboratório (Procedimentos), que irão gerar os registros de diferentes atividades (Figura 3.4).



Figura 3.4 - Pirâmide de documentos e registros.
(Adaptado de: Olivares, 2006)

É importante esclarecer que implementar um SGQ não compreende apenas a criação de diversos documentos que descrevam a forma de atendimento dos requisitos de uma determinada norma, como a ISO/IEC17025. É necessário, também, que tais documentos sejam seguidos adequadamente pelos funcionários do laboratório.

Assim, de maneira geral, um SGQ para um laboratório pode ser exemplificado de forma resumida (Figura 3.3) como um controle detalhado das atividades que podem afetar a fiabilidade do resultado, gerando evidência objetiva destes controles (através de registros) dentro de todo um funcionamento estabelecido pelo Manual da Qualidade (Olivares, 2006).

4 - Acreditação de Métodos Microbiológicos

4.1. Introdução

A acreditação não é mais do que a validação de métodos analíticos, comprovada através de evidências objetivas de que os requisitos para uma determinada aplicação ou uso específico são atendidos. Pode ser definida como o processo que confere validade a um método analítico, instrumento ou equipamento, cujas especificações são aceites como corretas, conferindo confiabilidade aos resultados obtidos (Silva e Alves, 2006).

Segundo a Norma NP EN ISO/IEC 17025, validação é a confirmação, através de um exame e a apresentação de uma evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização são cumpridos. Assim, a validação de um método analítico permite demonstrar que o método é *adequado ao uso* pretendido.

Embora para obter a acreditação os laboratórios devam cumprir com os requisitos presentes na ISO 17025, existem orientações específicas para os ensaios microbiológicos, tal como definido no Anexo B da NP EN ISO/IEC 17025.

Considera-se que a análise microbiológica inclui ensaios de esterilidade, deteção, isolamento, contagem e identificação de microrganismos (vírus, bactérias, fungos e protozoários) e seus metabolitos em diferentes materiais e produtos, ou qualquer tipo de ensaio que utilize os microrganismos, como uma parte de um sistema de deteção assim como a utilização de microrganismos para estudos ecológicos (Guia Relacre n.º6, 2006).

Assim, e conforme se detalhará em seguida, para um laboratório acreditar um método microbiológico, de acordo com a Norma NP EN ISO/IEC 17025, tem que levar a cabo várias etapas e cumprir com vários requisitos. Da bibliografia que aborda este tópico, o Guia da Relacre n.º6 é, sem sombra de dúvida, o documento que melhor descreve os principais requisitos para a acreditação de métodos microbiológicos, pelo que serviu de base para este subcapítulo.

4.2. Implementação do Método

Para a implementação de um dado método, será necessário proceder a uma pesquisa de forma a identificar os métodos existentes para a análise em questão. Para a seleção do

método dever-se-á ter em conta a complexidade e o tempo de análise, as condições existentes no laboratório que irão afetar os custos (equipamento, consumíveis, mão-de-obra), bem como o grau de seletividade e de sensibilidade. Os requisitos mínimos para a implementação de métodos microbiológicos são comuns aos vários métodos que venham a ser implementados num laboratório.

O planeamento e a execução da implementação seguem a sequência de trabalho:

- ✓ Definir a aplicação, objetivo e âmbito do método;
- ✓ Definir os parâmetros de desempenho e critérios de aceitação;
- ✓ Desenvolver um procedimento operacional para a implementação;
- ✓ Definir as experiências de validação;
- ✓ Verificar se as características de desempenho do equipamento estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo;
- ✓ Qualificar os materiais, por exemplo, padrões e reagentes;
- ✓ Executar experiências preliminares de validação;
- ✓ Ajustar os parâmetros do método e/ou critérios de aceitação, se necessário;
- ✓ Executar experiências completas de validação;
- ✓ Preparar um procedimento operacional para execução do método, na rotina;
- ✓ Definir critérios de revalidação (por exemplo, mudanças de pessoal, condições ambientais, equipamentos, periodicidade, etc), e
- ✓ Definir o tipo e a frequência de verificações de controle da qualidade analítica para a rotina.

4.2.1. Pessoal

Tendo em conta que o operador pode comprometer a qualidade dos resultados finais, em particular na área da microbiologia por contaminação cruzada, as análises microbiológicas devem ser efetuadas por, ou sob supervisão, de um analista com

experiência, qualificado e habilitado em Microbiologia a nível do ensino superior ou equivalente. A norma também considera como qualificações alternativas, a demonstração de extensa experiência no âmbito da acreditação do laboratório. As evidências de experiência de trabalho prático relevante têm que ser confirmadas, antes do pessoal estar autorizado a efetuar os ensaios sem supervisão ou antes de ser considerado como experiente para a supervisão de trabalho acreditado.

Quando são emitidas opiniões e interpretações dos resultados nos relatórios de ensaio, estas devem ser feitas por pessoal autorizado, com experiência adequada e conhecimentos relevantes no domínio em causa.

A formação e treino adequado ao desempenho dos ensaios e à utilização correta do equipamento devem ser sempre garantidos. Este deve incluir treino em técnicas básicas, como por exemplo, distribuição de meios em placas, contagem de colónias, técnicas de assepsia, quando tal não tenha já sido feito anteriormente. A competência do pessoal deve ser monitorizada, eventualmente com recurso a reciclagem.

Nas situações em que os métodos não são utilizados frequentemente, pode ser necessário avaliar o desempenho do pessoal para os realizar antes da sua execução efetiva, sendo que esta avaliação deve estar estabelecida e documentada, referindo nomeadamente a sua frequência.

A interpretação dos resultados dos ensaios para a identificação e verificação dos microrganismos está fortemente relacionada com a experiência e o desempenho de cada analista e deve ser sistematicamente controlada. Nalguns casos será mais apropriado relacionar a competência a uma técnica específica ou a um equipamento, do que a métodos de ensaio.

4.2.2. Instalações

Geralmente existem duas áreas nas instalações laboratoriais: área de apoio (entradas, corredores, blocos administrativos, vestiários, casas de banho, locais de armazenagem, arquivos, etc.) e os laboratórios propriamente ditos (locais onde são realizadas as análises microbiológicas e atividades associadas), sendo que para estes últimos são, geralmente, exigidos requisitos ambientais específicos.

Dependendo do tipo de ensaios, o acesso ao laboratório de microbiologia pode ser restrito a pessoal autorizado, e o pessoal deve ser avisado sobre:

- a) o uso previsto de uma área em particular;
- b) as restrições impostas no trabalho dentro de certas áreas;
- c) as razões de tais restrições;
- d) os níveis de confinamento apropriados.

O laboratório deve estar projetado de modo a minimizar os riscos de contaminação cruzada, sobretudo nos locais onde os riscos são significativos para o tipo de ensaios a realizar. Isto pode incluir, por exemplo:

- a) construir ou definir as áreas do laboratório de acordo com o princípio da "marcha em frente";
- b) executar os vários procedimentos, de forma sequencial, utilizando precauções apropriadas de modo a garantir as condições de ensaio e a integridade da amostra (ex. uso de recipientes fechados);
- c) gestão das atividades em termos de tempo ou de espaço.

Na generalidade, considera-se boa prática a utilização de salas separadas ou de áreas claramente definidas para o seguinte:

- ✓ a receção e registo de amostras com áreas destinadas ao armazenamento;
- ✓ a preparação de amostras (deve ser utilizado um local independente para a preparação de produtos em pó, eventualmente muito contaminados);
- ✓ a análise das amostras, incluindo incubação;
- ✓ a manipulação de microrganismos de referência;
- ✓ a preparação de meios de cultura e reagentes, incluindo esterilização;
- ✓ os ensaios de esterilidade;

- ✓ a descontaminação.

A área de lavagens (depois da descontaminação) pode ser partilhada com outros sectores do laboratório, desde que se acautelem as transferências de substâncias (vestígios) que possam afetar o crescimento microbiano. A vantagem da separação física deve ser analisada, com base em determinados parâmetros específicos para cada laboratório (ex. número e tipo de ensaios efetuados).

O equipamento de laboratório utilizado em rotina não deve ser deslocado de uma área para outra, de modo a evitar contaminação cruzada accidental. Por exemplo, em laboratórios de biologia molecular, pipetas, pontas, centrifugas, e restante material, devem ser exclusivos a cada área de trabalho (baixa, média e alta concentrações de ácido desoxirribonucleico (DNA)).

O espaço deve ser dimensionado de modo a permitir que as áreas de trabalho possam ser mantidas limpas e organizadas. Para tal deve ser tido em conta o volume de análises a efetuar e a organização geral do laboratório, em conformidade com o regulamento nacional, quando aplicável.

As salas de trabalho devem ser ventiladas de forma adequada, de forma natural ou forçada ou através de ar condicionado. No caso do ar condicionado, os filtros devem ser apropriados às características do laboratório e deve estar implementado um programa de inspeção, manutenção e substituição dos filtros, em função do tipo de trabalho.

A redução da contaminação pode conseguir-se mediante o seguinte:

- ✓ paredes, tetos, chão e superfícies de trabalho devem ser lisas (de forma a promover a eficiência na limpeza). Os azulejos e os mosaicos não são recomendados como revestimento de bancadas;
- ✓ junções côncavas das paredes com o chão e com o teto;
- ✓ redução ao mínimo das deslocações de ar durante a realização dos ensaios, mantendo as janelas fechadas e reduzindo ao mínimo a abertura das portas;
- ✓ ausência de estores interiores;

- ✓ acesso fácil para limpeza de estores interiores, se não for possível colocá-los no exterior do laboratório;
- ✓ as redes de fluidos não devem passar a descoberto sobre os locais de trabalho, devendo ser colocadas em calha adequada;
- ✓ entrada de ar no sistema de ventilação deve ser assegurada com filtro de eficiência adequada;
- ✓ sistema de lavagem de mãos preferencialmente de controlo não-manual;
- ✓ armários até ao teto;
- ✓ evitar madeira rugosa ou não tratada;
- ✓ superfícies de madeira dos encaixes e das juntas devem ser adequadamente seladas;
- ✓ materiais e equipamento dispostos de modo a facilitar a sua limpeza;
- ✓ ausência de mobiliário, documentos e outros itens que não sejam estritamente necessários para os ensaios;
- ✓ tetos perfeitamente lisos, com luz embutida.

No caso do tipo de construção não permitir que estas condições se verifiquem o laboratório deve evidenciar que é capaz de controlar os riscos daí resultantes e que dispõe de meios efetivos para os ultrapassar, por exemplo, um programa de limpeza e de desinfeção de superfícies.

Quando os laboratórios se encontram em instalações industriais, o pessoal deve estar informado da contaminação potencial das áreas de produção, e devem ser tomadas medidas apropriadas para evitar tal ocorrência.

4.2.3. Controlo Ambiental

Devem estar implementados programas de controlo ambiental apropriado, nomeadamente o controlo do ar através de exposição de placas de Petri e de zaragatoas de superfícies, tendo em conta os níveis de contaminação admissíveis para o tipo de

ensaios realizados. Os critérios devem ser estabelecidos e deve existir um procedimento documentado para situações em que estes limites sejam excedidos.

4.2.4. Higiene

Deve estar implementado um programa de limpeza e desinfecção para as instalações, equipamento e superfícies laboratoriais, devendo para isso ser tidos em conta a possibilidade de contaminação cruzada e os resultados do controlo ambiental. No caso de derrames acidentais, deve também estar implementado um procedimento.

Os laboratórios devem evitar a acumulação de pó, providenciar um mínimo de papéis no laboratório e nunca permitir a existência de plantas e objetos pessoais nas áreas de trabalho do laboratório.

No laboratório deve usar-se vestuário adequado ao tipo de ensaios a efetuar, sendo que geralmente uma bata é o suficiente, devendo este vestuário ser retirado quando se abandonam as áreas onde decorrem os ensaios.

Deve haver um equipamento adequado e de fácil manuseamento para lavagem das mãos.

4.3. Validação do Método

A extensão da validação necessária depende do método em estudo e da sua aplicação. Como os métodos normalizados são métodos validados, não é necessário realizar o processo completo de validação, desde que não ocorram alterações significativas dos mesmos. Entretanto, a conformidade dos métodos normalizados utilizados deve ser verificada sob condições reais de uso. É responsabilidade do laboratório verificar se as características de desempenho prescritas no método oficial podem ser obtidas.

Apesar disso, o laboratório deve validar métodos normalizados quando aplicados a matrizes não especificadas na norma.

Nos métodos microbiológicos qualitativos, onde os resultados são expressos como detetado / não detetado e em procedimentos de confirmação e identificação, a validação faz-se calculando, se apropriado, a especificidade, a exatidão, o desvio positivo, o

desvio negativo, o limite de detecção, o efeito matriz, a repetibilidade e a reprodutibilidade

Nos métodos microbiológicos quantitativos, a especificidade, a sensibilidade, a exatidão relativa, o desvio positivo, o desvio negativo, a repetibilidade, a reprodutibilidade e o limite de determinação, dentro de uma variabilidade definida, devem ser considerados e, se necessário, determinados quantitativamente nos ensaios. As diferenças devido às matrizes devem ser avaliadas quando se analisam diferentes tipos de amostra e os resultados devem ser avaliados aplicando métodos estatísticos apropriados.

A validação dos métodos em microbiologia deve refletir as condições reais dos ensaios. Assim, podem ser utilizadas amostras contaminadas naturalmente ou amostras contaminadas artificialmente com um nível de contaminação pré-definido. Embora a adição de microrganismos contaminantes a uma matriz simule de modo superficial uma contaminação natural, esta parece ser, na maioria das vezes, a melhor e a única solução.

Os dados de validação dos sistemas de ensaio comercializados (Kit's), usados no laboratório, devem ser mantidos. Estes dados podem ser obtidos através de ensaios colaborativos ou dados de validação fornecidos pelos fabricantes (validados por um organismo reconhecido). No caso de não estarem disponíveis, o laboratório deve responsabilizar-se pela validação completa do método.

Se for necessário introduzir qualquer modificação de modo a obter-se a mesma especificação do método original, deve-se proceder a ensaios de comparação, utilizando duplicados, de modo a assegurar que esta modificação é válida. O número de amostras ensaiadas e os resultados obtidos têm que ser estatisticamente válidos.

O laboratório deverá verificar regularmente que o desempenho documentado da validação é atingido, por exemplo, pelo uso de amostras contaminadas artificialmente ou materiais de referência com matrizes relevantes.

4.4. Incerteza da Medição

A abordagem geral para avaliar e expressar a incerteza em ensaios, é baseada nas recomendações produzidas pelo Comité Internacional de Pesos e Medidas (CIPM), como descrito no Guia para a Expressão da Incerteza na Medição, 1995, ISO Genebra.

Como referido, geralmente, os testes microbiológicos aparecem na categoria daqueles em que é excluído o rigor na validação dos cálculos metrológicos e estatísticos na medição da incerteza. Os componentes individuais da incerteza deverão ser demonstrados e identificados como estando sob controlo, e que os resultados avaliados contribuem para a sua variabilidade. Alguns componentes, (por exemplo pipetagens, pesagens e efeitos de diluição) podem ser prontamente medidos e facilmente avaliados para demonstrar uma contribuição negligenciável na determinação total da incerteza. Outros componentes, (por exemplo, preparação e estabilidade da amostra) não podem ser medidos diretamente e a sua contribuição não pode ser avaliada estatisticamente, contudo devem ser também considerados importantes na variabilidade dos resultados.

A distribuição do(s) microrganismo(s) na matriz do produto não é uma função da performance do laboratório, e por isso deverá ser especificado o tamanho da amostra a ser usada tendo em conta a sua fraca homogeneidade. Assim, não é recomendado que este componente da incerteza seja incluído nas estimativas, a não ser que as necessidades do cliente ditem o contrário.

O conceito de incerteza não pode ser aplicado diretamente em resultados de testes qualitativos (testes de deteção ou determinação dos atributos para identificação), no entanto fontes individuais de variabilidade, como por exemplo a consistência da performance dos reagentes, devem ser identificadas e demonstradas que estão sob controlo. Adicionalmente, para ensaios em que o limite de deteção é uma importante indicação da conformidade, a incerteza associada com o inóculo utilizado para determinar o limite, deve ser estimada e a sua significância avaliada.

Os laboratórios devem estar cientes da incidência de resultados falsos positivos e falsos negativos associados aos ensaios qualitativos usados.

4.5. Equipamento: Manutenção, Calibração e Verificação

O laboratório deve executar e documentar um programa para manutenção, calibração e verificação do funcionamento do equipamento como parte do sistema de gestão.

▪ **Manutenção**

Embora as instruções sobre a manutenção do equipamento possam ser encontradas na NP ISO 7218 (*Microbiologia-Requisitos gerais e orientações para exames microbiológicos*), de um modo geral, a manutenção do equipamento essencial deverá ser periódica e os intervalos devem ser determinados por fatores como, por exemplo, a taxa de utilização. Os respetivos registos detalhados devem ser guardados. No Anexo B, tabela B.1, são dados alguns exemplos da manutenção de equipamentos e respetiva periodicidade.

Deve ter-se em atenção a possibilidade de contaminação cruzada, originada a partir do equipamento, como por exemplo:

- ✓ equipamento descartável deve ser limpo e estéril quando apropriado;
- ✓ material de vidro reutilizável deve estar devidamente limpo e esterilizado quando apropriado;

Os laboratórios devem ter preferencialmente mais do que uma autoclave separada para a descontaminação, apesar disso, se forem tomadas as precauções adequadas para separar os ciclos de descontaminação e esterilização e um programa de limpeza documentado, poderá haver só uma.

O material e o equipamento devem ser mantidos limpos e inspecionados periodicamente quanto à integridade, verificação geral e, quando relevante, à esterilidade, nomeadamente:

- ✓ material de uso geral - aparelhos de filtração, recipientes de plástico ou vidro (frascos, tubos de ensaio), placas de Petri de plástico ou vidro, equipamentos para amostragem, ansas e fios retos de platina, níquel/crómio ou em plástico descartável;
- ✓ banhos de água, estufas de incubação, câmaras de fluxo laminar, autoclaves, homogeneizadores, frigoríficos, congeladores;
- ✓ equipamento volumétrico, tais como, pipetas, pipetadores automáticos, inoculadores em espiral;

- ✓ instrumentos de medição, tais como, termômetros, cronômetros, balanças, potenciômetros de pH, contadores de colônias.

- ***Calibração e Verificação do Funcionamento***

Deve ser estabelecido um plano para calibração e verificação do equipamento que possa ter uma influência direta nos resultados de ensaio. A frequência destas calibrações e verificações deve ser determinada pela experiência e deve ser baseada na necessidade, tipo e funcionamento anterior do equipamento. Os intervalos entre as calibrações e verificações devem ser inferiores ao tempo que o equipamento funciona entre limites aceitáveis. Exemplos de intervalos de calibração e verificação de funcionamento para vários instrumentos de laboratório encontram-se no Anexo B, tabela B.2 e B.3. Além disso, algum equipamento merece particular atenção, nomeadamente:

a) Aparelhos de Medição da Temperatura

Quando a temperatura tem uma influência direta nos resultados das análises ou é crítica para o funcionamento correto do equipamento, os aparelhos de medição de temperatura têm que ser de qualidade apropriada para atingirem a exatidão necessária (ex. termómetro de vidro, termopares e termómetros de resistência de platina utilizados em incubadoras e autoclaves).

Os aparelhos de medição de temperatura devem ser calibrados e rastreáveis a padrões nacionais ou internacionais. Sempre que a exatidão da medição de temperatura não tenha um efeito direto no resultado dos ensaios, podem ser usados aparelhos de trabalho com especificações aceites por entidades nacionais ou internacionais reconhecidas (ISO 1770 para termómetros de vidro). Estes aparelhos podem ser usados, por exemplo, para monitorizar frigoríficos e congeladores e também estufas e banhos de água onde a tolerância da temperatura o permita. Deve realizar-se a verificação de funcionamento destes aparelhos, se necessário.

b) Estufas e Câmaras de Incubação, Banhos de Água e Fornos

A estabilidade, a uniformidade da distribuição da temperatura e o tempo requerido para atingir condições de equilíbrio em estufas de incubação, banhos de água, estufas de ar seco e salas, deverá ser estabelecido inicialmente e documentado, em particular no que

se refere às utilizações habituais, por exemplo a posição, o espaço intermédio e a altura de pilhas das caixas de Petri. A constância das características registadas durante a validação inicial do equipamento deve ser verificada e registada após cada reparação ou alteração significativas. Os laboratórios devem fazer registos e guardar as medições de temperatura do equipamento utilizado nos ensaios.

c) Autoclaves, incluindo os de esterilização de meios

Os testes quantitativos dos materiais processados por autoclavagem, capazes de indicar convenientemente uma variação no interior e entre as diferentes cargas, podem fornecer garantia da qualidade. Além disso, a calibração e o estabelecimento e monitorização do desempenho, podem incluir:

- ✓ As autoclaves devem ter capacidade para atingir tolerâncias de tempo e temperatura especificadas. As autoclaves apenas equipadas com válvulas de pressão não são aceitáveis. Os sensores usados para controlar ou monitorizar os ciclos operativos exigem calibração e o cronómetro deve ser verificado;
- ✓ O funcionamento de cada autoclave deverá ser inicialmente avaliado (estudo da distribuição da temperatura espacial) para cada ciclo operativo e para as diferentes configurações de carga usadas na prática. Este processo operativo deve ser repetido após uma reparação ou alteração significativa (ex. substituição do programador ou do termoregulador, ciclo operativo) ou quando indicado pelo controlo de qualidade do meio. Sensores de temperatura em número suficiente devem ser colocados dentro da carga (isto é, em contentores cheios com líquido) capazes de localizar e demonstrar diferenças. No caso de esterilização de meio, onde a uniformidade de temperatura não pode ser demonstrada por outro meio, é considerada apropriada a utilização de dois sensores, um adjacente à sonda de controlo e outro remoto a partir do 1º. A validação e revalidação considera a adequabilidade dos tempos de subida e descida, assim como o tempo à temperatura de esterilização;
- ✓ Devem ser fornecidas instruções claras de manuseamento baseadas nos perfis de aquecimento, determinados pelo uso típico durante a validação/revalidação. Os critérios de aceitação/rejeição devem estar estabelecidos e os registos da

operação da autoclave, incluindo a temperatura e o tempo mantidos para cada ciclo;

- ✓ O controlo será conseguido por um dos seguintes processos: (i) um termopar e um registador com o fim de produzir um gráfico ou impressão; (ii) observação direta e registo da temperatura máxima atingida e do tempo a essa temperatura.

A eficácia do seu funcionamento durante cada ciclo pode ser verificada através do uso de indicadores químicos ou biológicos para esterilização/descontaminação. A fita indicadora de esterilização para autoclave deve ser usada só para mostrar que uma carga foi processada, mas não como indicador para demonstrar que um ciclo aceitável de esterilização terminou.

d) Massas e Balanças

As massas e as balanças devem estar calibradas com rastreabilidade em intervalos de tempo regulares (de acordo com o seu uso).

e) Equipamento Volumétrico

Os laboratórios devem efetuar uma verificação inicial e posteriores verificações regulares, com o objetivo de assegurar que o equipamento está de acordo com as especificações requeridas. Não é necessária uma verificação do material de vidro que tenha sido certificado a tolerâncias específicas.

A verificação deve ser feita quanto à exatidão do volume obtido em comparação com o volume fixado (para instrumentos de volume variáveis) e a precisão de quantidades repetidas deve ser calculada.

No caso de material descartável, os fornecedores devem ser empresas com sistemas de qualidade reconhecidos e relevantes e após verificação inicial da adequabilidade do material, recomenda-se que sejam efetuadas verificações aleatórias em relação à exatidão. Nos casos em que as empresas não possuam sistemas de qualidade reconhecidos e relevantes, os laboratórios devem verificar a adequabilidade em cada lote de equipamento.

f) Outro Equipamento

Outros equipamentos incluem os medidores de condutividade, de oxigénio e de pH que devem ser regularmente verificados ou antes de cada utilização. As soluções tampão utilizadas para verificações devem ser armazenadas em condições apropriadas e marcadas com data de validade.

Os cronómetros, incluindo os das autoclaves, devem ser verificados usando um cronómetro calibrado.

Quando nos métodos se utilizam centrifugas deve ser feita uma avaliação crítica da força centrífuga e quando esta for crítica a centrífuga necessita calibração.

4.6. Reagente e Meios de Cultura

▪ *Reagentes*

A qualidade dos reagentes usados deve ser assegurada e adequada aos ensaios realizados. Inicialmente e durante o período de validade, os laboratórios devem verificar a conformidade de cada lote de reagentes críticos para o ensaio, utilizando organismos de controlo positivo e negativo de coleções de culturas nacionais ou internacionais reconhecidas.

▪ *Meios de Cultura Preparados no Laboratório*

A adequabilidade do comportamento dos meios de cultura, diluentes e outras suspensões preparados no laboratório, deve ser avaliada, quando relevante, no que diz respeito a:

- ✓ recuperação ou sobrevivência dos organismos alvo;
- ✓ inibição ou supressão dos organismos não alvo;
- ✓ propriedades bioquímicas (diferenciais e diagnósticas);
- ✓ propriedades físicas (ex. pH, volume e esterilidade).

As matérias-primas, tanto as usadas nas formulações comerciais desidratadas, como os componentes individuais, devem ser armazenadas em condições apropriadas, e todos os

recipientes, especialmente os que contenham meios desidratados, devem estar hermeticamente fechados. Os meios desidratados que se apresentem em pedra, com grumos ou com alteração de cor, não devem ser utilizados.

Para a preparação dos meios deve utilizar-se água destilada, desionizada ou produzida por osmose inversa, livre de substâncias bactericidas, inibidoras ou interferentes, salvo se o método de ensaio especificar de outra forma.

O período de validade dos meios preparados nas condições de conservação especificadas deve ser determinado e verificado.

▪ ***Meios de Cultura Prontos a Usar***

Todos os meios (incluindo diluentes e suspensões) prontos a usar ou parcialmente completos devem estar validados antes da sua utilização. A avaliação do desempenho na recuperação ou sobrevivência dos organismos alvo e a inibição ou supressão dos organismos não alvo tem que ser inteiramente quantitativa; os atributos (por exemplo, propriedades físicas e bioquímicas) devem avaliar-se usando critérios objetivos.

O laboratório tem que estar devidamente informado das especificações de qualidade do fabricante que devem incluir, pelo menos o seguinte:

- ✓ nome dos meios e lista de componentes, incluindo quaisquer suplementos;
- ✓ período de validade e critérios de aceitação aplicados;
- ✓ condições de armazenagem;
- ✓ plano e frequência de amostragem;
- ✓ controlo de esterilidade;
- ✓ controlo do crescimento dos microrganismos alvo e não alvo (em relação a culturas de referência) e critérios de aceitação;
- ✓ controlos físicos e critérios de aceitação aplicados;
- ✓ data de emissão das especificações.

Os lotes dos meios devem estar devidamente identificados, de modo a permitir a rastreabilidade.

O laboratório deve assegurar que será notificado pelo fabricante, no caso de qualquer alteração nas especificações de qualidade. Quando o fabricante dos meios (prontos a usar diretamente ou de uma forma parcialmente completa), dispuser de um sistema de qualidade reconhecido (por exemplo, um certificado segundo a série ISO 9000), o laboratório poderá verificar, através da validação inicial, que o produto pronto a usar cumpre as especificações estabelecidas, partindo do pressuposto de que o produto é homogêneo. Em outras circunstâncias será necessário realizar controlos adequados em cada lote recebido.

4.7. Rotulagem

De modo a permitir a identificação correta e a rastreabilidade, todos os reagentes (incluindo as soluções de reserva), meios, diluentes e outras suspensões deverão estar adequadamente rotulados de modo a indicar a identidade, concentração, condições de armazenagem, data de preparação, prazo de validade e/ou períodos de armazenagem recomendados. A pessoa responsável pela preparação deve ser identificável através dos registos.

4.8. Materiais e Culturas de Referência

- *Materiais de Referência*

Materiais de referência (MR) e materiais de referência certificados (MRC), fornecem a rastreabilidade necessária às medições e são usados, por exemplo, para:

- ✓ demonstrar a exatidão dos resultados;
- ✓ calibrar equipamento;
- ✓ monitorizar o desempenho do laboratório;
- ✓ validar métodos;
- ✓ permitir a comparação de métodos.

Os MR devem ser usados, sempre que possível, nas matrizes apropriadas.

- ***Culturas de Referência***

As culturas de referência são necessárias para estabelecer o desempenho dos meios (incluindo “Kits”), para validação de métodos e para avaliação contínua do desempenho. A rastreabilidade é necessária, por exemplo, quando se pretende estabelecer o desempenho do meio, dos “kits” e validação de métodos.

Para demonstrar a rastreabilidade, os laboratórios devem usar estirpes de referência de microrganismos obtidos diretamente de uma coleção reconhecida nacional ou internacional. Em alternativa podem ser usados derivados comerciais para os quais tenha sido demonstrado, pelo laboratório, serem equivalentes em todas as características relevantes, nas condições de utilização.

Segundo as orientações da Norma ISO 11133-1 (*Orientações gerais sobre a garantia da qualidade para a preparação de meios de cultura no laboratório*), as estirpes de referência podem ser sub-cultivadas uma vez para obter “stocks” de referência. Em paralelo, e quando aplicável, deve-se verificar se a estirpe se mantém pura e com as suas características bioquímicas. Recomenda-se que a conservação dos “stocks” de referência seja feita em alíquotas ultracongeladas ou liofilizadas.

As culturas de trabalho para serem usadas na rotina devem ser previamente sub-cultivadas a partir do “stock” de referência (Anexo C). Se o “stock” de referência tiver sido descongelado, não podem ser recongelados e reutilizados.

Os “stocks” de trabalho não devem ser sub-cultivados, exceto se tal for requerido e definido por um método normalizado ou se os laboratórios puderem documentar que não houve alteração de nenhuma característica relevante. Além disso, não devem ser sub-cultivados para substituir “stocks” de referência. Os derivados comerciais de estirpes de referência só devem ser usados como culturas de trabalho.

4.9. Amostragem

Nos casos em que a amostragem é acreditada, o transporte e armazenagem devem ser feitos em condições que mantenham a integridade da amostra (em refrigeração ou

congelamento, quando apropriado). As condições devem ser monitorizadas e os registos guardados.

A colheita da amostra deve ser feita por pessoal especializado e em condições de assepsia utilizando material esterilizado. As condições ambientais relativas à contaminação do ar e temperatura devem ser monitorizadas e registadas no local da colheita, bem como a hora da colheita.

A análise das amostras deve ser executada o mais rapidamente possível após a colheita e deve estar de acordo com os regulamentos nacionais e/ou internacionais.

4.10. Manuseamento e Identificação da Amostra

É importante verificar e registar as condições em que as amostras se encontram ao chegar ao laboratório, pelo que o laboratório deve ter um procedimento relativo à aceitação e identificação de amostras. Se uma amostra for insuficiente ou se encontrar em condições precárias devido à deterioração física, temperatura incorreta, embalagem estragada ou rotulagem deficiente, o laboratório deve consultar o cliente antes de decidir se realiza a análise ou rejeita a amostra. Em qualquer dos casos as condições da amostra devem ser indicadas no relatório de ensaio.

O laboratório deve registar toda a informação relevante e particularmente a seguinte:

- ✓ data e, quando relevante, a hora de receção;
- ✓ condições de receção da amostra e, quando necessário, a temperatura;
- ✓ características do trabalho de amostragem (data da amostragem, condições da amostragem, etc.)

Enquanto não são examinadas, as amostras devem ser armazenadas em condições apropriadas de modo a evitar quaisquer modificações nas populações microbianas presentes. As condições de conservação devem ser definidas e registadas.

A preparação da amostra pelo laboratório deve ser feita imediatamente antes da sua análise considerando-se parte do ensaio. A preparação da amostra deve ser efetuada de acordo com as normas nacionais ou internacionais específicas, quando aplicáveis, ou

por métodos internos validados. Procedimentos de sub-amostragem deverão ter em conta a distribuição dos microrganismos.

Deve existir um procedimento que defina como reter e eliminar amostras. As amostras devem ser conservadas até à obtenção dos resultados ou enquanto for necessário. As porções das amostras laboratoriais que se sabe estarem altamente contaminadas devem ser descontaminadas antes de irem para o lixo.

4.11. Remoção do Lixo Contaminado

A eliminação correta dos materiais contaminados pode não influenciar diretamente a qualidade da análise e das amostras, contudo, este procedimento é uma boa prática laboratorial e deve estar em conformidade com os regulamentos ambientais ou de saúde nacionais/internacionais e regulamentos de segurança.

4.12. Controlo da Qualidade do Desempenho

▪ *Controlo da Qualidade Interno*

O controlo de qualidade interno consiste em procedimentos efetuados pelo laboratório para uma avaliação contínua do trabalho do mesmo. O objetivo principal é assegurar a consistência dos resultados no dia-a-dia e, a sua conformidade com os critérios definidos.

Assim, é necessário um programa de verificações periódicas para demonstrar que a variabilidade (entre analistas e entre equipamentos ou materiais) está sob controlo. Todos os ensaios incluídos no âmbito da acreditação do laboratório têm de estar cobertos. Os procedimentos podem envolver:

- ✓ o uso de amostras contaminadas;
- ✓ o uso de materiais de referência (incluindo ensaios interlaboratoriais);
- ✓ ensaios de replicados;
- ✓ avaliação de resultados de ensaios de replicados.

A periodicidade destas verificações depende do tipo de procedimentos e do número de ensaios. Recomenda-se, quando possível, que os ensaios incorporem controlos para monitorizar o desempenho.

Nas situações em que um laboratório é acreditado para um ensaio que raramente é realizado, aceita-se um esquema para demonstrar um desempenho satisfatório feito em paralelo com o ensaio, pode ser apropriado.

- ***Avaliação Externa da Qualidade***

Os laboratórios devem utilizar a avaliação de qualidade externa, não apenas para avaliar o desvio do laboratório, mas também para verificar a validade de todo o sistema de qualidade.

Assim, devem participar regularmente em ensaios interlaboratoriais que sejam relevantes para o âmbito da acreditação, devendo ser dada preferência a esquemas de ensaios interlaboratoriais que usem matrizes apropriadas. Em casos específicos a participação deve ser obrigatória.

4.13. Relatórios de Ensaios

Tendo em conta a natureza dos ensaios na área da microbiologia, se o resultado da contagem for negativo, deve ser referido como *não detetado para uma determinada unidade* ou *inferior ao limite de deteção para uma determinada unidade*. O resultado não deve ser dado como *zero para uma determinada unidade* a menos que seja uma exigência regulamentada. Os resultados de ensaios qualitativos devem ser referidos como *detetado/não detetado numa determinada quantidade ou volume*. Também podem ser expressos como *menor que um número específico de microrganismos para uma determinada unidade* quando o número específico de microrganismo excede o limite de deteção do método e isso foi acordado com o cliente.

Quando uma estimativa da incerteza do resultado é expressa no relatório de ensaio, quaisquer limitações (particularmente se a estimativa não incluir no cálculo a componente de distribuição dos microrganismos dentro da amostra) têm de ser bem esclarecidas ao cliente.

5 – Caso de Estudo: Acreditação do Método de Pesquisa e Quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*

5.1. Qualidade das Águas das Piscinas

A utilização de piscinas tem sofrido nos últimos anos um enorme crescimento devido a uma maior consciencialização da importância social e dos benefícios físicos, psicológicos e terapêuticos que esta atividade proporciona aos elementos de comunidades com tendências cada vez mais sedentárias, convivendo em células cada vez mais restritas e sujeitos a um crescente stress. Este incremento na utilização de piscinas deve-se ainda a fatores como o nível de poluição das águas fluviais e costeiras e à crescente dificuldade no acesso às praias por sobrelotação ou distância geográfica.

Para a minimização dos perigos e riscos associados à utilização destes equipamentos foi necessário compreender e controlar a variedade e complexidade dos processos bioquímicos que podem ocorrer nos ecossistemas aquáticos e encontrar soluções e alternativas mais adequadas à especificidade não só de cada tipo de piscina, mas também do tipo e frequência de utilização, de modo a permitir uma fruição segura destes desejados espaços coletivos de convívio e lazer (Vasconcelos e Duarte, 2006).

Segundo o Decreto-Lei n.º 82/2009 de 2 de Abril, na sua alínea a) do número 3 do artigo 5º, compete às autoridades de saúde *vigiar o nível sanitário dos aglomerados populacionais, dos serviços, estabelecimentos e locais de utilização pública e determinar as medidas corretivas necessárias á defesa da saúde publica* (ARS Norte, 2011).

No caso das piscinas e tendo em consideração os diversos perigos que poderão estar associados à sua utilização, a operacionalização destas competências deverá incluir, entre outras atividades, a vigilância epidemiológica de eventos adversos para a saúde associados à frequência de piscinas ou dos trabalhadores desses locais e a vigilância sanitária da qualidade da água dos tanques (DGS, 2009).

Nem a qualidade da água nem a especificação das condições de instalação e de funcionamento de piscinas (à exceção das incluídas em recintos com diversões aquáticas, em empreendimentos turísticos e das destinadas à hidroterapia) são objeto de

regulamentação. A Diretiva nº 23/93, de 24 de Maio, do Conselho Nacional de Qualidade (CNQ), fixa com carácter geral as disposições de segurança, higieno-sanitárias, técnicas e funcionais que devem ser observadas nas piscinas de uso público (ARS Norte, 2011). São excluídas da aplicação da presente diretiva, as piscinas para usos exclusivamente terapêuticos ou termais, nas quais se desenvolvam atividades submetidas a um controlo sanitário específico (Diretiva CNQ n.º 23/93).

Esta Diretiva não tem força de lei, podendo apenas ser usada como uma referência. Assim, nas ações de vigilância a desenvolver, sob a responsabilidade das Autoridades de Saúde, devem existir critérios e procedimentos uniformizados, bem como ser garantida a existência de planos de identificação, monitorização e controlo de riscos, de modo a que a saúde e segurança dos utilizadores, trabalhadores e visitantes seja assegurada.

Os parâmetros de qualidade que devem ser medidos com maior frequência (6 horas), pela sua importância e face à facilidade e economia da sua determinação, são o pH, o teor de desinfetante residual, a turvação e a temperatura. Além disso, em piscinas públicas e semi-públicas impõe-se uma monitorização mínima quinzenal de parâmetros microbiológicos e químicos (Vasconcelos e Duarte, 2006).

O controlo do pH da água da piscina é essencial para assegurar a eficiência dos processos de coagulação e desinfecção e reduzir a deterioração das componentes dos sistemas de tratamento, devendo situar-se entre 7,2 e 7,8 no caso de desinfecção com produtos clorados e entre 7,2 e 8,0 no caso de produtos não clorados (WHO, 2006). Valores inferiores a estes podem provocar irritação nos olhos e na pele, enquanto que valores superiores aos recomendados favorecem o aumento da turvação e implicam um maior consumo de desinfetante (Vasconcelos e Duarte, 2006).

A concentração de desinfetante residual necessária para garantir a qualidade microbiológica varia com o tipo de produto utilizado, com as características e controlo de qualidade da água das instalações, sendo que no caso de produtos clorados as concentrações devem variar entre 0,4 a 0,6 mg/L de cloro residual livre (Vasconcelos e Duarte, 2006).

O controlo da qualidade microbiológica da água das piscinas públicas e semi-públicas com desinfecção deve ser efectuado através duma monitorização de rotina a quatro indicadores principais: *bactérias heterotróficas*, *coliformes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Legionella spp*, com frequência recomendada conforme a tabela 5.1. Os valores limite estabelecidos para estes indicadores nas normas da WHO (2006) são também apresentados nesta tabela.

Tabela 5.1 - Controlo da qualidade microbiológica da água de piscinas, valores limite e frequência de amostragem.

Tipo de piscina		<i>Bactérias heterotróficas</i>	<i>Coliformes/ E. coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Legionella spp</i>
Pública (utilização intensa)	Frequência	semanal	semanal	quando necessário	trimestral
	Limite máximo (NMP/100mL)	200 /1mL	1	1	1
Semi-pública	Frequência	mensal	mensal	quando necessário	trimestral
	Limite máximo (NMP/100mL)	200 /1mL	1	1	1

(Adaptado de: WHO, 2006).

Para além disto, outros indicadores comuns são usualmente verificados, conforme a tabela 5.2. Estes indicadores à exceção da transparência referem-se a bactérias, que podem existir nas fezes, na pele, nas secreções nasais, na expetoração, etc., e por isso aparecem na água quando são introduzidas, por vezes inconscientemente, pelos banhistas. Assim, recomenda-se uma frequência quinzenal da amostragem e obtenção de ausência total de coliformes e estreptococos fecais, de *Pseudomonas aeruginosa* e de estafilococos aureus (coagulase positiva), admitindo-se um limite de 10 NMP/100 mL, para os coliformes totais e de 100 NMP/1 mL para mesófilos aeróbios totais a 37°C.

Tabela 5.2 - Indicadores mais comuns de qualidade da água das piscinas, sua origem, valores admissíveis e frequência de amostragem.

Indicadores de Higiene	Valor máximo Admissível	Frequência da Análise	Origem
Transparência	Visualização perfeita do disco de Secchi a 10 ou mais metros*	4 por dia	Sujidade da água, crescimento de algas, etc.
Coliformes totais	< 10/100 mL	quinzenal	Secreções nasais, expetoração, fezes, urina, solo (terra, etc.)
Coliformes fecais	0/100 mL		Fezes
Estreptococos fecais	0/100 mL		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/100 mL		Feridas da pele, ouvidos inflamados, olhos inflamados
Estafilococos aureus (coagulase positiva)	0/100 mL		Feridas da pele secreções nasais, expetoração, urina, ouvidos inflamados
Estafilococos coagulase negativa	< 20/100 mL		Pele
Mesófilos aeróbios totais (a 37°C)	< 100/1mL		Sujidade dos banhistas, e das paredes/canalizações

(Adaptado de: Portal de Saúde Pública)

5.2. *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é um organismo Gram negativo em forma de bastonetes (Figura 5.1) e inclui bastonetes direitos ou ligeiramente curvos, com 0,5 a 1,0 µm de largura e 1,5 a 5,0 µm de comprimento. A sua mobilidade é assegurada por um ou vários flagelos polares.



Figura 5.1 - *Pseudomonas* sp: bacilos Gram-negativos.

(Adaptado de: <http://www.bact.wisc.edu>)

As *Pseudomonas* podem ser pesquisadas nas águas subterrâneas ou de consumo, nas águas de piscinas ou nas águas minerais, contando-se entre os organismos patogênicos cuja identificação se afigura mais interessante. A *Pseudomonas aeruginosa* é produtora de piocianina com capacidade para se desenvolver em meio de cultura contendo cetrimida. É oxidase e catalase positiva, fluorescente em luz ultra violeta (Mendes e Oliveira, 2004).

5.2.1. Manifestações Clínicas

A *Pseudomonas aeruginosa* é o principal patogênico humano do grupo das pseudomonas, podendo causar infecções oportunistas especialmente em pacientes imunocomprometidos, como vítimas de queimaduras, pacientes com cancro ou fibrose cística. Crescem facilmente mesmo em condições desfavoráveis aos outros microrganismos e possuem resistência intrínseca e adquirida aos antimicrobianos mais comuns, sendo causa frequente de infecções nosocomiais, sendo responsável por 15% das bacteremias causadas por bactérias Gram-negativas (<http://www.ebah.com.br>).

Geralmente as infecções de feridas traumáticas ou cirúrgicas e queimaduras, produzem um exsudato azul-esverdeado devido a libertação de dois pigmentos, a piocianina (azul) e pioverdina (verde).

A otite externa branda dos nadadores, é uma das manifestações clínicas mais usuais, já que a bactéria é amplamente encontrada em ambientes aquáticos. Além disso, outras manifestações incluem a otite externa maligna (invasiva) em pacientes diabéticos; infecção ocular após lesão traumática ou procedimentos cirúrgicos; sepse fatal, principalmente em lactentes e indivíduos muito debilitados (pacientes com leucemia e linfoma que foram submetidos a radioterapia ou quimioterapia, pacientes com queimaduras muito graves), eczema gangrenoso, necrose hemorrágica da pele que ocorre na sepse por *Pseudomonas aeruginosa*; meningite, quando introduzida por punção lombar, etc. (Figura 5.2).

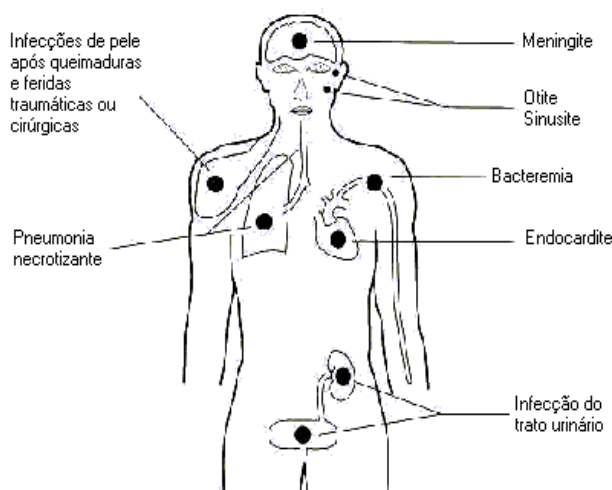


Figura 5.2 - Tipos comuns de infecção por *Pseudomonas aeruginosa*.
(Adaptado de: Baron's Medical Microbiology 4th edition, 2000)

As medidas de controlo da infecção por pseudomonas incluem utilização de materiais estéreis, evitando a sua contaminação durante a manipulação; realização cuidadosa de técnicas assépticas; lavagem das mãos antes e depois de manipular o paciente; realização de controle periódico da qualidade da água e dos alimentos e evitar uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro para evitar a seleção de culturas resistentes.

5.3. Pesquisa e Quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*

Existem dois métodos básicos para a pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*: o método da inoculação de meio líquido em tubos múltiplos com leitura do Número Mais Provável (NMP) e o método da filtração por membrana com inoculação em meio sólido.

A legislação portuguesa, Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto, à semelhança da norma internacional ISO 16266:2008, indicam como referência o método de filtração por membrana, porque, para além de outras vantagens permite-nos obter resultados diretos em menos tempo e com menos custos (Tabela 5.3) De facto, a maioria dos laboratórios acreditados em Portugal para a pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizam este método.

Tabela 5.3 - Vantagens e desvantagens da filtração por membrana em relação à inoculação de tubos múltiplos e determinação do NMP.

Vantagens da Filtração por Membrana	Desvantagens da Filtração por Membrana
Tem boa reprodutibilidade	As amostras com água muito turva impedem a filtração de grandes volumes
Os resultados são relativamente rápidos	Quando existe grandes populações de outras bactérias, o crescimento pode ser demasiado elevado para permitir a contagem
Os filtros podem ser transferidos para diferentes meios de cultura	Se existirem metais e fenóis presentes na amostra, podem adsorver aos filtros e inibir o crescimento bacteriano
Permite o processamento de grandes volumes de amostra de forma a aumentar a sensibilidade do teste	
As filtrações podem ser efetuadas no local de recolha da água	
É um método mais económico que o NMP	

(Adaptado de: Abelho, 2010)

A Direção Geral da Saúde (DGS), na Circular Normativa nº14/DA de 21 de Agosto de 2009, considera a norma europeia EN 12780 como sendo a norma de referência para a pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* em águas de piscinas, no entanto, esta norma foi definitivamente substituída pela norma internacional EN ISO 16266:2008 (British Standards). Esta informação vai de encontro às recomendações efetuadas pelo IPAC que considera a norma ISO 16266:2006 como sendo a norma de referência, para a pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*, à qual está associado o método da membrana filtrante.

5.3.1. Princípio do Método

▪ Filtração

A técnica da membrana filtrante para a quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* baseia-se na filtração de volumes adequados de água (Figura 5.3), mediante pressão negativa (vácuo), através da membrana filtrante, com porosidade de 0,45µm. As bactérias, que apresentarem dimensões maiores que os poros da membrana, ficarão retidas na superfície, a qual será então transferida para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura seletivo e diferencial, que por capilaridade se difundirá, para a membrana, entrando em contato com as bactérias.



Figura 5.3 - Etapas do processo de Filtração por Membrana para *Pseudomonas aeruginosa*.
(Adaptado de: www.sartorius.com)

▪ Enumeração

Após um período determinado de incubação ((36 ± 2) °C durante (44 ± 4) horas) desenvolvem-se colónias com características típicas, achatadas com diâmetro de aproximadamente 0,8 a 2,2mm, com cor verde/azulada (colónias produtoras de piocianina) (Figura 5.4), que poderão ser observadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Os resultados devem vir expressos em Unidades Formadoras de Colónias/Volume de amostra (UFC/mL).

▪ Confirmação

Para colónias com outras características (castanho/avermelhado ou fluorescentes com cor não verde e não azul), são feitas provas de confirmação que contemplam a pesquisa da oxidase, produção de amónia a partir de um caldo de acetamida e a fluorescência em meio King B.

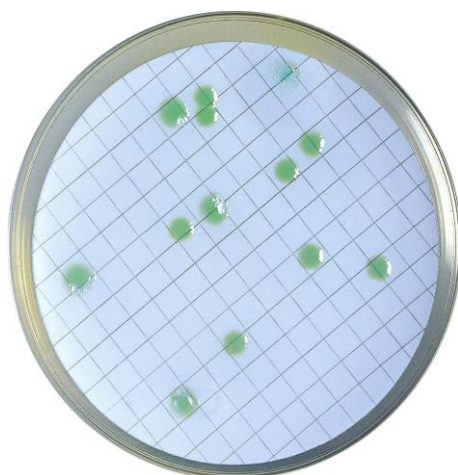


Figura 5.4 - Meio CN Agar com presença de *Pseudomonas*.
(Adaptado de: <http://www.pvl.pt>)

5.3.2. Meios de Cultura e Reagentes

A *Pseudomonas aeruginosa* cresce bem em todos os meios comuns de laboratório, mas o isolamento específico do organismo, contra a contaminação vinda do ambiente, é melhor realizado por meios que contenham um agente seletivo e também componentes para aumentar a produção de pigmento. A maioria dos meios seletivos depende da resistência intrínseca das espécies a diferentes agentes antibacterianos (<http://www.eximlab.com.br>).

O meio de cultura utilizado para o isolamento seletivo de *Pseudomonas aeruginosa* e outras espécies do género, é o meio *Cetrimida Agar Base*, habitualmente chamado de CN Agar.

A finalidade do meio de cultura seletivo é como o próprio nome indica, selecionar as espécies que se deseja isolar e impedir o desenvolvimento de outras (adição de corantes, antibióticos e outras substâncias com capacidade inibitória para algumas espécies (ex. Agar Manitol Salgado e Agar SS). O meio de cultura diferencial possibilita a distinção entre vários géneros e espécies de microrganismos, por possuir substâncias que permitem uma diferenciação presuntiva, evidenciada na mudança de coloração ou na morfologia das colónias (ex. Agar Eosin Methilene Blue (EMB), Agar McConkey e Agar Hektoen) (Gerard et al, 2012).

Assim, a composição do meio CN Agar foi desenvolvida com o objetivo de facilitar a seleção de *Pseudomonas aeruginosa* e estimular a formação de pigmentos (Tabela 5.4).

Este meio é muito semelhante ao meio King B, em que o cloreto de magnésio e o sulfato de potássio promovem a formação de piocianina, pioverdina e piomelanina. A peptona serve como fonte de azoto e o glicerol é usado como carbono e fonte de energia. A cetrimida (brometo de cetiltrimetilamina) é um composto amónio quaternário, que inibe uma vasta variedade de outros organismos, incluindo outras espécies de *Pseudomonas* (<http://www.britanialab.com.ar>).

Tabela 5.4 - Composição do meio CN Agar.

Fórmula (em gramas por litro)	
Peptona de Gelatina	16,0
Hidrolisado de Caseína	10,0
Sulfato de Potássio	10,0
Cloreto de Magnésio	1,4
Glicerol	10 mL
Agar	11,0 a 18,0
Cetrimida	0,2
Ácido Nalidíxico	0,015

(Adaptado de: ISO 16266:2008)

Os meios de cultura e reagentes utilizados para a análise microbiológica, podem ser preparados diretamente no laboratório, seguindo a composição e as instruções de preparação indicadas na norma de referência ISO 16266:2008, ou comprados a um fornecedor acreditado na sua área de atuação. Neste caso, as instruções de utilização dos meios de cultura e reagentes deverão ser as indicadas pelo fabricante.

5.4. Validação do Método

Conforme referido, um laboratório pode validar métodos normalizados ou, no outro extremo, métodos não normalizados, desde que adequados para a realização dos ensaios previstos. No caso em estudo, a validação prevê a utilização de um método normalizado, sem qualquer extensão ou modificação, pelo que neste caso é necessário evidenciar os registos que demonstrem a sua implementação em cumprimento com as características de desempenho do mesmo.

5.4.1. Procedimento do Ensaio

O procedimento experimental a implementar, referente à análise e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* em águas de piscinas, pelo método da membrana filtrante, é claro e objetivo e está de acordo com o referencial ISO 16266:2008.

As principais etapas do método, de acordo com o esquema apresentado na figura 5.6, encontram-se detalhadas no Anexo D e incluem resumidamente:

- **Identificação da Amostra**, identificar a amostra a ser analisada e definir os volumes a serem filtrados, em função de sua procedência, nomeadamente no caso de águas de piscinas volumes de 100 mL, já que se trata de águas tratadas;
- **Filtração da Amostra e Incubação**, após filtração da amostra, incubação do filtro em placas de Petri com CN Agar a 36 ± 2 °C durante 44 ± 4 horas;
- **Leitura dos Resultados**, ao microscópio são identificadas colónias azul/verde como *Pseudomonas aeruginosa* e colónias fluorescentes com cor não azul e não verde e castanho avermelhado como presumíveis de *Pseudomonas aeruginosa*;
- **Testes de Confirmação**, para as colónias fluorescentes com cor não azul/não verde será realizada a prova de produção de amónia, para colónias castanho/avermelhado será realizada a prova de pesquisa da oxidase e a prova de pesquisa de fluorescência. Para as colónias com oxidase e fluorescência positiva, será também feita a prova de produção de amónia;
- **Interpretação dos Resultados**, considera-se que existe presença de *Pseudomonas aeruginosa* em todas as colónias com cor azul/ verde, todas as colónias fluorescentes com cor não verde/ azul que produzem amónia e todas as colónias castanho/ avermelhado que são oxidase positiva, produzem fluorescência e amónia a partir de acetamida, conforme tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Interpretação dos resultados na detecção e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*.

Descrição da colónia em CN Agar	Produção de Amónia a partir de Acetamida	Produção de Oxidase	Fluorescência em King's	Confirmado como <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Azul /Verde	Não testado	Não testado	Não testado	Sim
Fluorescência	Positivo	Não testado	Não testado	Sim
Castanho /Avermelhado	Positivo	Positivo	Positivo	Sim
Outros tipos	Não testado	Não testado	Não testado	Não

- **Registos**, todos os resultados devem ser devidamente registados, conforme exemplo do Anexo E, incluindo sempre as leituras intermédias (provas de confirmação, repicagens, características de colónias, entre outras) para a apresentação do resultado final. As folhas de registo deverão ser rubricadas pelo responsável pela execução da análise e responsável pelas leituras;
- **Expressão dos resultados**, Pesquisa: A pesquisa é dada como “presença” sempre que for detetado e “ausência” sempre que não for detetado, ambas por volume de amostra. Quantificação: As contagens de *Pseudomonas aeruginosa* são expressas em Unidade Formadoras de Colónias (UFC) por volume de amostra;
- **Diluições**, Os volumes e as diluições das amostras, devem ser escolhidos de modo a que o número de colónias a serem contadas no filtro seja entre 20 e 80. Para águas tratadas, filtrar 100 mL da amostra. Para águas poluídas, filtrar volumes menores, ou diluir a amostra antes da filtração. No caso de serem feitas diluições estas têm que ser tidas em conta na expressão dos resultados (quantificação).

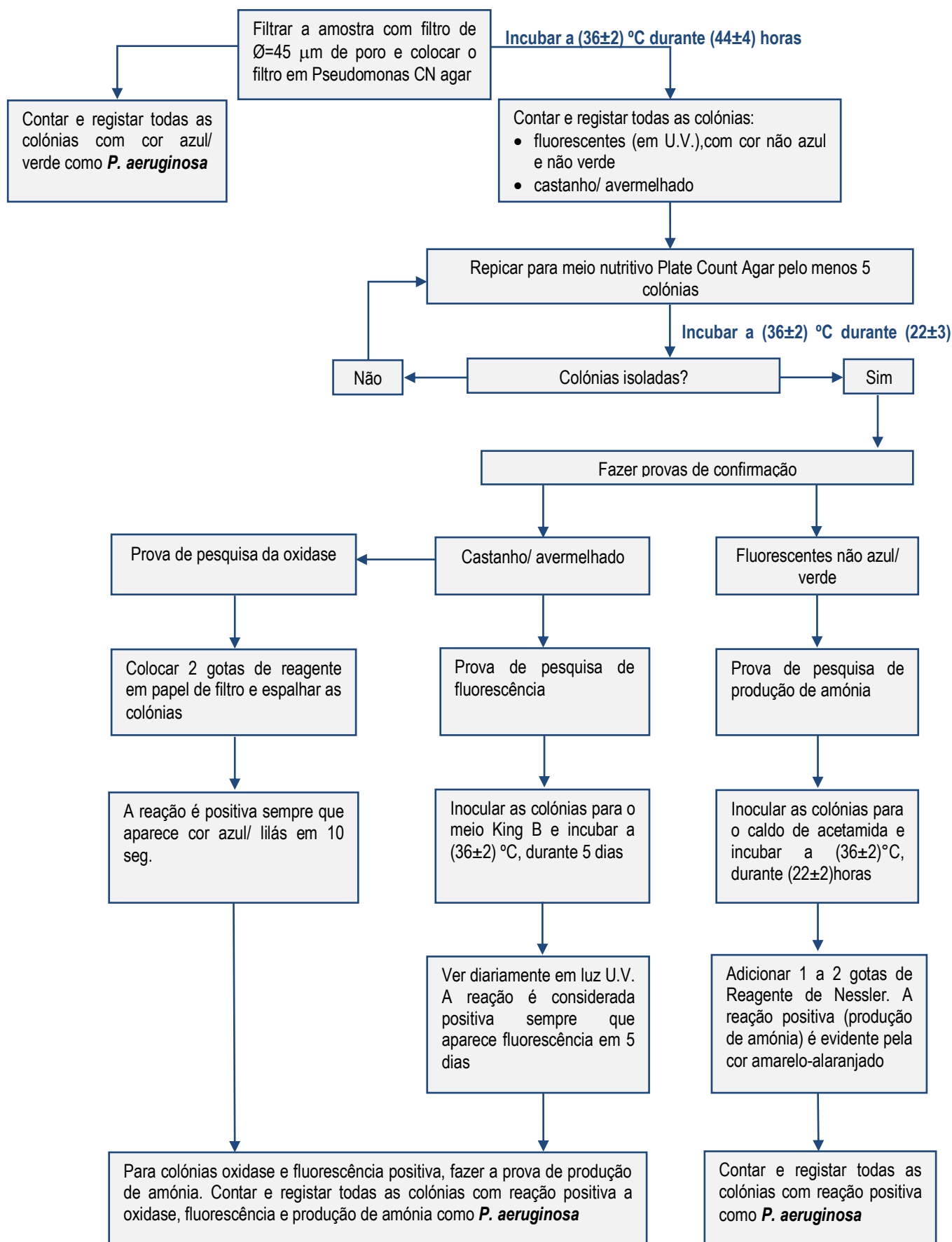


Figura 5.5 - Fluxograma para pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* segundo a ISO 16266.

5.4.2. Registos

Para a validação do método deve garantir-se que todo o material do laboratório se encontra devidamente lavado e esterilizado, bem como o ambiente onde decorrerá a análise. Deste modo dever-se-á ter-se em atenção as condições relativas ao Controlo Interno da Qualidade apresentadas no Capítulo 4 deste trabalho.

Além disso, é necessário mostrar evidências, ou seja registos, que comprovem:

- a) Controlo de qualidade da água destilada a ser empregue nos meios de cultura e soluções, que deve ser de alta qualidade, livre de substâncias que possam afetar a sobrevivência e crescimento dos microrganismos (substâncias tóxicas ou nutritivas);
- b) Manutenção e calibração do potenciómetro, usado para acerto de pH dos meios. A sua calibração deve ser feita antes de cada período de utilização com duas soluções tampão padrão, de acordo com o pH do meio de cultura ou solução que estiver a ser preparada (ex: pH= 7,0 e pH= 4,0 ou pH= 10). Determina-se o pH do meio de cultura e regista-se o valor. O meio é rejeitado caso o valor de pH se encontre fora dos limites especificados;
- c) Controlo e manutenção das estufas de incubação, autoclaves e termómetros:
 - i. **Incubadoras 22°C, 36°C, 44°C** – Deve manter-se a temperatura uniforme na faixa requerida, respetivamente ($36\pm 2^\circ\text{C}$), ($22\pm 2^\circ\text{C}$) e ($44\pm 0,5^\circ\text{C}$). O termómetro utilizado para o controle da incubadora deve ter a escala graduada em incrementos de $0,5^\circ\text{C}$ ou menos e estar imerso em água ou glicerol;
 - ii. **Autoclaves – Testes de Desempenho e de Esterilidade** – A autoclave deve manter a temperatura de esterilização de 121°C durante o ciclo, o qual não deve exceder 45 minutos para um tempo de esterilização de 15 minutos, simultaneamente far-se-á o teste de desempenho (deve ser quinzenal) com a utilização de duas ampolas como indicadores biológicos, preenchidas com os esporos bacterianos resistentes ao calor, *Bacillus stearothermophilus*. Se

após o período de teste não houver alteração de cor do indicador, significa que o desempenho do autoclave é positivo e prossegue-se com a operação;

iii. Termómetros – Devem ter escala, sensibilidade e exatidão adequada ao uso. Quando possível, deve dar-se preferência à utilização de termómetros digitais, em substituição dos de mercúrio;

- d) O controlo e manutenção de balanças devem fazer-se mensalmente e para tal devem seguir-se as instruções do fabricante. A adequação das balanças também deve ser tida em conta: ao pesar 2 g ou menos, utilizar uma balança analítica com uma sensibilidade inferior a 1 mg para uma carga de 10 g. Para maiores quantidades utilizar uma balança de prato com uma sensibilidade de 0,1 g com uma carga de 150 g;
- e) Controlo de esterilização nomeadamente da rampa de filtração, filtros, águas de diluição e meios, no mínimo, no final de cada série de amostras, utilizando uma água reagente estéril como amostra. Para testar a esterilidade dos meios, incubar uma porção representativa de cada lote a uma temperatura adequada durante 24 a 48h e observar se há crescimento. Alternativamente, passar assepticamente 100 mL ou mais de água de diluição através de um filtro de membrana e colocar o filtro em meio de cultura adequado para bactérias heterotróficas. Incubar a $35 \pm 0,5$ ° C por 24 horas e observar se há crescimento. Se há indicação de contaminação, determinar a causa e rejeitar estes materiais;
- f) Controlo da qualidade dos reagentes usados, nomeadamente para a elaboração dos meios de cultura (caso em que são feitos no laboratório) com o registo dos lotes usados (rastreabilidade), condições de armazenamento e qualidade analítica. Armazenar os meios de cultura em condições que impeçam qualquer modificação da sua composição, isto é ao abrigo da luz e à dissecação e num frigorífico a (5 ± 3) °C, se necessário. É geralmente recomendado 4 semanas de armazenamento para placas e 6 meses para frascos e tubos. A data de validade para meios armazenados deve ser estabelecida. Antes de qualquer utilização observar sempre qualquer alteração de cor, sinal de evaporação/desidratação ou crescimento microbiano. Lotes de meios que mostram tais mudanças não devem ser

utilizados. Antes de serem utilizados ou antes de mais aquecimento, recomenda-se que os meios de cultura sejam equilibradas à temperatura ambiente;

- g) Controlo de qualidade dos meios de cultura, quer sejam feitos no laboratório, quer sejam comprados, que deve incluir ensaios com bactérias de referência. Para todos os meios confeccionados, colocar no mínimo 10% do lote preparado na estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas para o controle de esterilidade. Após esta etapa não deve haver mudança de cor nem crescimento de qualquer colónia. Para o controle de crescimento, sempre que possível usar estirpes ATCC, estirpes de referências de origem e padrão definido de provas para a sua caracterização. Se não for possível o uso de estirpes ATCC, usar estirpes 100% positivas para os controles de qualidade de crescimento realizados;
- h) Utilização de materiais de referência, de acordo com o procedimento estabelecido pelo fabricante. Os materiais de referência são utilizados nos ensaios de rotina de acordo com o parâmetro realizado, sendo repicados para meio nutritivo de modo a serem utilizados na realização do controlo positivo e/ou negativo de meios (Tabela 5.6) e reagentes de confirmação, com a periodicidade definida;

Tabela 5.6 - Controlo de qualidade positivo e negativo para os meios de cultura.

Controlo de Qualidade	Positivo	Negativo
Estirpe de Referência	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Meio Seletivo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , crescimento com aparecimento de pigmento verde-azulado, fluorescente	<i>Escherichia coli</i> , inibição completa
Interpretação dos Resultados	Crescimento com aparecimento de pigmento, esverdeado	Não há crescimento nem aparecimento de pigmentos
Prova Oxidase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (desenvolvimento de cor roxa)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (sem alteração da cor)

- i) Efetuar ensaios em duplicado, para o cálculo do Critério de Precisão Intermédia (o qual representa a variação máxima admissível do laboratório, em condições de reprodutibilidade, e do analista, em condições de repetibilidade) e da incerteza (a

qual caracteriza a dispersão de valores que podem ser atribuídos à contagem. O ensaio consiste em efetuar a análise duas vezes mantendo as mesmas condições de execução. Por outro lado, para além de duplicados de amostra (realizados pelo mesmo analista) são também realizados duplicados de campo (onde são colhidas 2 réplicas da mesma amostra e posteriormente analisadas independentemente pelo mesmo analista. Se o laboratório realiza menos de 10 ensaios / semana, deve fazer duplicado das análises em pelo menos uma amostra cada semana;

- j) Realização de ensaios em branco com o objetivo de avaliar as condições em que as análises são efetuadas. O *Branco* é realizado com água ultra pura, esterilizada em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Sempre que o valor do *Ensaio em Branco* for diferente de zero é necessário avaliar o impacto nas amostras. Deste modo, se todas as amostras forem positivas é necessário repetir os ensaios; se existirem amostras sem crescimento aceitam-se os resultados das amostras;
- k) Todos os registos em geral devem ser convenientemente arquivados para permitir a rastreabilidade.

A tabela 5.7 apresenta um breve resumo das principais evidências do Controlo Interno da Qualidade a efetuar num laboratório para a pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 5.7 - Controlo Interno da Qualidade.

Ensaio	Crítérios	Periodicidade	Ações a desenvolver quando os critérios não são cumpridos
Branco por série de amostra	0	Por série de amostras	1. Há amostras 0: Aceitar 2. Não há amostras 0: Rejeitar
Duplicado de Amostra	Precisão	1 por semana	1. Aceitar o maior valor 2. Identificar a causa
Controlo Positivo Provas confirmação	Positivo	Por série de amostras	1. Identificar a causa (Meio, reagentes de confirmação, MR, temperaturas, etc.)
Controlo Negativo Provas confirmação	Negativo		
Materiais de referência (M.R.)	Positivo/negativo	Semanalmente	2. Avaliar a necessidade de rejeitar amostras
Teste de Esterilidade – Consumíveis comerciais (verificar Certificado de Lote)	Sem crescimento e performance semelhante ao lote anterior Verificar certificado do fornecedor	Por lote de meio de cultura	Rejeitar
Monitorizar a qualidade da Água Reagente	Sem crescimento e performance semelhante ao lote anterior Verificar certificado do fornecedor	Através de calendarização anual	Rejeitar
Verificar a exatidão das Balanças	Sensibilidade	Mensalmente	1. Não utilizar 2. Identificar a causa e corrigir
Verificar temperatura: Incubadora a 36°C Incubadora a 22°C Incubadora a 44°C	36 ± 2.°C 22 ± 2.°C 44 ± 0,5 °C	Em contínuo	Avaliar a necessidade de rejeitar as amostras
Verificar Autoclave Desempenho (<i>Bacillus stearothermophilus</i>) Esterilidade (termómetro de máxima)	Sem alteração de cor (Especificação do fabricante) 121± 3.°C	Quinzenalmente Em cada utilização	1. Não utilizar 2. Identificar a causa e corrigir
Controlo de esterilização da rampa de filtração	Germes 37.°C=0	Por série de amostras	1. Não utilizar 2. Identificar a causa e corrigir

6 – Considerações Finais

A principal conclusão a retirar do trabalho desenvolvido é a de que a implementação de um Sistema de Gestão da Qualidade é uma mais-valia diferenciadora perante o mercado de ensaios de análises, de águas ou outras, sobretudo porque existe legislação comunitária e nacional que exige a acreditação para a realização de determinadas atividades. Os laboratórios de ensaio e calibração que estiverem conformes com a norma ISO 17025 demonstram assim a sua competência para produzir dados e resultados tecnicamente válidos. O Sistema de Gestão da Qualidade vai permitir melhorar a imagem do laboratório no mercado, responder a um mercado mais exigente, aumentar a sua credibilidade pela garantia da confidencialidade, trabalhar de forma a tomar decisões imparciais, e aumentar a confiança do cliente aquando da aquisição de um ensaio e/ou calibração acreditado. A acreditação de laboratórios, é assim um processo fundamental, sendo uma ferramenta decisiva para o reconhecimento oficial das determinações que efetuam.

Concluiu-se também que um laboratório para ser credível deve adotar a acreditação e não a certificação pela ISO 9001, porque a acreditação contém em simultâneo o sistema da qualidade e confere a respetiva competência técnica ao laboratório.

Pretendeu-se com este estudo, apresentar uma metodologia para acreditação do método de pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* em águas de piscinas, pelo método da membrana filtrante (ISO 16266:2008), de acordo com os requisitos da NP EN ISO /IEC 17025:2005. Do trabalho efetuado ficou patente que os requisitos técnicos da norma ISO 17025 podem ser obstáculos difíceis de ultrapassar, pelo que a acreditação pode variar muito entre áreas e entre métodos. Por outro lado a validação de métodos normalizados implica, para além dos requisitos de qualidade, os registos de evidências do controlo de todo o processo.

7 - Referências Bibliográficas

- Abelho, M. (2010). *Manual de Monitorização Microbiológica Ambiental*. Qualidade Microbiológica da Água. Curso de Especialização Tecnológica em Qualidade Ambiental. Escola Superior Agrária de Coimbra.
- Abreu, R. A. (2002). *Preparando a sua Organização para a ISO 9000*. Rio de Janeiro, Brasil. Acedido em 25/05/2013, em <http://www.mgerhardt-consultorias.com.br/material/0810/G9%20%20Preparando%20a%20empresa%20para%20a%20ISO%209000.pdf>.
- Administração Regional de Saúde do Norte. *Orientações para a execução do programa de vigilância sanitária de piscinas – Ano 2012*. Departamento de Saúde Publica. Porto. ARS Norte, 2011.
- Almeida, J. A. S. e Pires, Ângela C. (2006). *Acreditação: Vantagens e dificuldades da implementação de um Sistema da Qualidade num laboratório de ensaio e /ou calibração*. Química 101. Lisboa. Pg. 37-38.
- APCER (2010). *Guia Interpretativo NP EN ISO 9001:2008*.
- Baron, S. (2000). *Medical Microbiology, 4th edition*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas.
- Barradas, J., Sampaio, P. (2011). *ISO 9001 or ISO 17025: What is more importante for the metrology laboratory* . Proceedings of 12th International Symposium on Quality, Osijek, Croácia.
- Beirão, G. e Cabral, S. (2002). *The reaction of the Portuguese stock market to ISO 9000 certification*. Total Quality Management, Vol. 13, N.º 4. Pg. 465-474.
- Bhuiyan, N. e Alam, N. (2005). *An investigation into issues related to the latest version of ISO 9000*. Total Quality Management, Vol. 16, N.º 2. Pg. 199-213.
- Buttle, F. (1997). *ISO 9000: marketing motivations and benefits*. International Journal of Quality & Reliability Management, Vol. 14, N.º 9. Pg. 936-947.

- Casadesús, M. e Castro, R. de (2005). *How improving quality improves supply chain management: empirical study*. The TQM Magazine, Vol. 17, N.º 4. Pg. 345-357.
- Casadesús, M.; Gerusa, G. e Heras, I. (2001). *Benefits of ISO 9000 – Implementation in Spanish industry*. European Business Review, Vol. 13, N.º 6. Pg. 327-335.
- Coelho, M. (2006a). *Portugal está no bom caminho em matéria de Qualidade*. País Económico, nº 50.
- Coelho, M. (2006b). *Certificação: Inovar para Ganhar o Futuro*. Dossier especial Qualidade do Jornal Expresso.
- Coelho, M. (2006c). *Certificação não é cura miraculosa para empresas enfraquecidas*. Entrevista publicada no dossier Qualidade do jornal Vida Económica, a 3 de Novembro de 2006. *Os benefícios e as dificuldades na certificação da qualidade – Norma NP EN ISO 9001:2008*.
- Corbett, C.; Luca, A. e Pan, Jen-Nan (2003). *Global perspectives on global standards – a 15-economy survey of ISO 9000 and ISO 14000*. ISO Management Systems.
- Decreto-Lei n.º 82/2009, de 2 de Abril – *Estabelece o regime jurídico da designação, competência e funcionamento das entidades que exercem o poder de autoridades de saúde*.
- Decreto-Regulamentar n.º 5/97, de 31 de Março – *Regula a instalação e funcionamento dos recintos com diversões aquáticas*.
- Dick, G. P. M. (2000). *ISO 9000 certification benefits, reality or myth?*. The TQM Magazine, Vol. 12, N.º 6. Pg. 365-371.
- Dick, G.; Galimore, K. e Brown, J. C. (2002). *Does ISO 9000 accreditation make a profound difference to the way service quality is perceived and measure?* Managing Service Quality, Vol. 12: Pg. 1, 30-42.
- Direcção-Geral da Saúde – *Programa de Vigilância Sanitária de Piscinas. Circular Normativa n.º 14/DA*. Lisboa: DGS, 2009.

- Diretiva nº. 23/93 – *A qualidade nas piscinas de uso público*. Conselho Nacional da Qualidade. Lisboa.
- EN ISO 9000:2005 – *Sistemas de Gestão da Qualidade, Fundamentos e Vocabulário*. Instituto Português da Qualidade, Lisboa, Portugal.
- Feng, M.; Terziovski, M. e Samson, D. (2008). *Relationship of ISO 9001:2000 quality system certification with operational and business performance*. Journal of Manufacturing Technology Management, Vol. 19, N.º 1. Pg. 22-37.
- Furtado, A. (2003). *Impacte da Certificação ISO 9000 nas empresas portuguesas*. Portuguese Journal of Management Studies, 8 (2). Pg. 173-203.
- Ganhão, F. N. e Pereira, A. (1992). *A Gestão da Qualidade – como implementá-la na empresa*. Lisboa, Editorial Presença. Pg. 177.
- Gerard T., Berdell F. and Christine C. (2012). *Microbiologia*. 10ª Edição. Editora Artmed. Pg. 166-169.
- Guia para a Aplicação da NP EN ISO/IEC 17025. IPAC (2010).
- Guia Relacre n.º6. (2006). *Acreditação de Laboratórios de Ensaios Microbiológicos*. 2ª Edição.
- Heras, I.; Casadesús, M. e Ochoa, C. (2001). *Effects of ISO 9000 certification on companies' profitability: an empirical study*. 6th International Conference on ISO 9000 and TQM, Ayr, Scotland.
- Heras-Saizarbitoria, I., Casadesús M. & Marimón, F. (2011). The impact of ISO 9001 standard and the EFQM model: The view of the assessors. *Total Quality Management & Business Excellence*, Vol. 22, N.º2. Pg. 197-218.
- Huang, F.; Horng, C. e Chen, C. (1999). *A study of ISO 9000 process, motivation and performance*. Total Quality Management, Vol. 10, N.º 7. Pg. 1009-1025.
- ISO 16266:2008 – *Water quality – Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa – Method by membrane filtration*. 1st edition.

- Juran, J. M. e Godfrey, A. B. (1998). *Juran's quality handbook — 5th edition*. Estados Unidos da América, Editora McGraw-Hill. Pg. 314.
- Madeira, A. et al. (2009). *Manual Prático para a Gestão e Qualidade nas Organizações*. Lisboa, Edições Verlag Dashöfer.
- Magd, Hesham A. E. (2006). *An investigation of ISO 9000 adoption in Saudi Arabia*. Managerial Auditing Journal, Vol. 21, N.º 2. Pg. 132-147.
- Marimon, F.; Casadesús, M. e Heras, I. (2006). *ISO 9000 and ISO 14000 standards: an international diffusion model*. International Journal of Operations & Production Management, Vol. 26, N.º 2. Pg. 141-165.
- Mendes, B. e Oliveira, J.F.S (2004). *Qualidade da água para consumo humano*. Lisboa, Lidel - Edições Técnicas. Pp; 570 e 571.
- NP EN ISO/IEC 17000:2005. NP EN ISO/IEC 17000:2005. *Avaliação da conformidade. Vocabulário e princípios gerais*. Instituto Português da Qualidade, Lisboa, Portugal.
- NP EN ISO/IEC 17025:2005. *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*. Instituto Português da Qualidade, Lisboa, Portugal.
- NP EN ISO/IEC 9001:2008. *Sistemas de gestão da qualidade - Requisitos*. Instituto Português da Qualidade, Lisboa, Portugal.
- NP ISO 7218 - *Microbiologia - Requisitos gerais e orientações para exames microbiológicos*. Instituto Português da Qualidade, Lisboa, Portugal.
- Oakland, John S., (2000). *Total Quality Management: text with cases*. 2ª Edição, Oxford, Butterworth-Heinemann. Pg. 4.
- Olivares, I.R.B.,(2006) *Gestão de Qualidade em Laboratórios*. Campinas: Editora Átomo. Pg. 101.
- Pinto, Abel e Soares, Iolanda (2010). *Sistemas de Gestão da Qualidade – Guia para a sua Implementação*. Lisboa, Edições Sílabo. Pg. 16, 32-34.

- Pires, António Ramos (2007). *Qualidade, Sistemas de Gestão da Qualidade*. Lisboa, Edições Sílabo.
- Pizzolato, M., Caten, C. S., Jornada, J. A. H. (2008). *A influência do sistema de gestão de laboratórios nos resultados dos ensaios de proficiência da construção civil*. *Jornal Gestão e Produção*, Volume 15, N.º 3. Pg. 579-589.
- Prajogo, Daniel I. (2008). *The sustainability of ISO 9001 in a legal service organization*. *The Service Industries Journal*, Vol. 28, N.º 5. Pg. 603-614.
- Regulamento (CE) n.º 765/2008 de 9 Julho de 2008 - *Estabelece os requisitos de acreditação e fiscalização do mercado relativos à comercialização de produtos, e revoga o Regulamento (CEE) n.º 339/93*.
- Sampaio, P. e Saraiva, P. (2012). *Barómetro da Certificação '11*. Guia de Empresas Certificadas. Cem palavras, n.º6.
- Sampaio, P.; Saraiva, P. e Rodrigues, A. G. (2009). *ISO 9001 certification research: questions, answers and approaches*. *International Journal of Quality & Reliability Management*, Vol. 6 N.º 1. Pg. 38-58.
- Silva, A. P. e Alves, Miriam C. C. (2006). *Como iniciar a validação de métodos analíticos*. ENQUALAB-2006 - Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia. São Paulo, Brasil. Pg. 8-9.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998). 20th Edition, Ed. Pub. APHA, AWWA and WEF, 1998.
- Vasconcelos, J.L.C. & Duarte, A.A.L.S. (2006). *Tratamento da água de piscinas públicas. Análise comparativa de sistemas de desinfecção aplicada a um caso de estudo*. In Vieira, J.P. & Matos, J.S. (eds.). "Planeamento estratégico em águas e resíduos: actas do Encontro Nacional de Saneamento Básico, 12, Cascais, Portugal, 2006" [CD-ROM]. Cascais: APESB, 2006. ISBN 978-972-95302-8-9.
- VIM (2008). *Vocabulário Internacional de Metrologia*. Instituto Português da Qualidade, Lisboa, Portugal.

WHO (2006). *Guidelines for safe recreational waters*. Volume 2. Swimming pools and similar recreational-water environments.

Webgrafia:

URL: <http://www.who.int/water>, acedido a 01-02-2013.

URL:<http://www.saudepublica.web.pt>, acedido em 01-02-2013.

URL: <http://www.crq4.org.br>, acedido em 20-05-2013.

URL:<http://www.iapmei.pt>, acedido em 20-05-2013.

URL: <http://www.iso.org>, acedido em 22-05-2013.

URL:<http://www.qualityteste.com.br>, acedido em 22-05-2013.

URL: <http://www.ipac.pt>, acedido em 24-05-2013.

URL:<http://cempalavras.pt>, acedido em 06-06-2013.

URL: <http://www.ebah.com.br>, acedido em 22-08-2013.

URL: <http://www.bact.wisc.edu>, acedido em 22-08-2013.

URL: www.sartorius.com, acedido em 17-09-2013.

URL: professor.ucg.br, acedido em 17-09-2013.

URL: <http://shop.bsigroup.com>, acedido em 19-09-2013.

URL: <http://www.britanialab.com>, acedido em 19-09-2013.

ANEXO A – Registros

A2 – Plano Anual

Logotipo da Empresa	PLANO ANUAL DE C/CO/M DE: <input style="width: 100%;" type="text"/>	Página: <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> Data: <input style="width: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px;" type="text"/> Elaborado: <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/> Aprovado: <input style="width: 100%; height: 20px;" type="text"/>														
ANO: <input style="width: 150px;" type="text"/>																
CÓDIGO	DESIGNAÇÃO	RESPONSABILIDADE	PERIODICIDADE	OPERAÇÃO	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
OPERAÇÕES: CI - Calibração Interna Co - Controlo CE - Calibração Externa ME - Manutenção Especial																

A3 – Relatório de Calibração / Controlo Interno

Logotipo da Empresa	RELATÓRIO DE CALIBRAÇÃO/CONTROLO INTERNO N.º <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div>		
EIME: <input style="width: 250px; height: 20px;" type="text"/>	Data: <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>		
Equipamento Utilizado:	<input style="width: 95%; height: 20px;" type="text"/>		
Padrão de Referência:	<input style="width: 95%; height: 20px;" type="text"/>		
Calibração/Controlo N.º:	<input style="width: 95%; height: 20px;" type="text"/>		
<input type="checkbox"/> Calibração	<input type="checkbox"/> Controlo		
RESULTADOS OBTIDOS			
VALORES NOMINAIS	VALORES MEDIDOS	ERRO	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO
Incerteza da Calibração:		<input style="width: 95%; height: 20px;" type="text"/>	
Conclusões:			
O Executante:	<input style="width: 180px; height: 20px;" type="text"/>	O Responsável:	<input style="width: 180px; height: 20px;" type="text"/>

ANEXO B – Equipamento

Tabela B1 - Guia para Manutenção do Equipamento

TIPO DE APARELHO	REQUISITOS	FREQUÊNCIAS SUGERIDA
(a) Incubadores, (b) frigoríficos, (c) congeladores, estufas	Limpar e desinfectar as superfícies internas	(a) Mensalmente (b) Quando necessário (por ex., de 3 em 3 meses) (c) Quando necessário (por ex., anualmente)
Banho de água	Esvaziar, limpar, desinfectar e reencher	Mensalmente ou cada seis meses se for usado um biocida
Centrífuga	a) Revisão b) Limpeza e desinfectação	a) Anualmente b) Após cada utilização
Autoclave	a) Verificações visuais de borracha (vedação), limpeza/câmara de drenagem b) Revisão completa c) Verificação da segurança da câmara de pressão	a) Regularmente, com o recomendado pelo fabricante b) Anualmente ou como recomendado pelo fabricante c) Anualmente
Cabinas de segurança	Revisão completa e verificação mecânica	Anualmente ou como recomendado pelo fabricante
Câmara de fluxo laminar	Revisão e verificação mecânica	Anualmente ou conforme o recomendado pelo fabricante
Microscópio	Manutenção completa	Anualmente
Medidor pH	Lavar o eléctrodo	Cada utilização
Balanças / Diliuidores gravimétricos	a) Limpeza b) Revisão	a) Cada utilização b) Anualmente
Destilador	Lavar e descalcificar	De acordo com as necessidades (por ex. de 3 em 3 meses)
Desionizador unidade de osmose reversa	Substituir cartuchos / membranas	Conforme recomendado pelo fabricante
Jarras de anaerobiose	Limpeza / desinfectação	Cada utilização
Distribuidores de meio, equipamento volumétrico, pipetas e equipamento geral	Descontaminação, limpeza e esterilização conforme apropriado	Cada utilização
Plaqueadores em espiral	a) Revisão b) Descontaminação, limpeza e esterilização	a) Anualmente b) Cada utilização
Laboratório	a) Limpar e desinfectar as superfícies de trabalho b) Limpar o chão, desinfectar esgotos e lavatórios c) Outras superfícies	a) Diariamente e durante utilização b) Semanalmente c) De 3 em 3 meses

(Adaptado de: Guia Relacre, 2006)

Tabela B.2 - Guia de Calibração e Verificação de Calibração

TIPO DE APARELHO	REQUISITO	FREQUÊNCIA SUGERIDA
Termômetros de referência (termômetro de vidro)	Recalibração completamente rastreável. Ponto único (por exemplo ponto de fusão do gelo)	De cinco em cinco anos Anualmente
Termopares de referência	Recalibração completamente rastreável Verificação contra termômetro de referência	De três em três anos Anualmente
Termômetros de trabalho e Termopares de trabalho	Verificação contra termômetro de referência no ponto de fusão e/ou gama de temperatura de trabalho	Anualmente
Balanças	Calibração totalmente rastreável	Anualmente
Pesos de calibração	Calibração totalmente rastreável	De cinco em cinco anos
Peso(s) de verificação	Verificação contra pesos calibrados ou balança recentemente calibrada	Anualmente
Cronômetros	Verificação contra sinal horário nacional	Anualmente
Material de vidro volumétrico	Calibração gravimétrica para a tolerância requerida	Anualmente
Microscópios	Calibração rastreável da objectiva micrométrica (onde apropriado)	Inicialmente
Higrômetros	Calibração rastreável	Anualmente
Centrifugas	Calibração rastreável ou verificação contra um tacômetro independente, quando apropriado.	Anualmente

(Adaptado de: Guia Relacre, 2006)

Tabela B.3 - Guia para Validação do Equipamento e Verificação do Funcionamento

TIPO DE APARELHO	REQUISITOS	FREQUÊNCIA SUGERIDA
Equipamento de temperatura controlada (incubadoras, banhos, frigoríficos, congeladores)	a) Estabelecer a estabilidade/uniformidade da temperatura b) Monitorizar temperatura	a) Inicialmente, de dois em dois anos e depois de reparação/modificação b) Diariamente/cada utilização
Estufa de esterilização	a) Estabelecer estabilidade/uniformidade da temperatura b) Monitorizar temperatura	a) Inicialmente de dois em dois anos e depois de reparação/modificação b) Cada utilização
Autoclave	a) Estabelecer características para cargas típicas/ciclos típicos b) Monitorizar temperatura/tempo	a) Inicialmente de dois em dois anos e depois de reparação/modificação b) Cada utilização
Cabines de segurança	a) Estabelecer tipo de funcionamento b) Monitorização microbiológica c) Monitorização do fluxo de ar	a) Inicialmente, anualmente e depois de reparação/modificação b) Semanalmente c) Cada utilização
Câmara de fluxo laminar	a) Estabelecer tipo de funcionamento b) Verificar com placas de esterilidade	a) Inicialmente e depois de reparação/modificação b) Semanalmente
Microscópio	Verificação do alinhamento	Diariamente/cada utilização
Medidor de pH	Verificação da calibração usando pelo menos dois tampões	Diariamente/cada utilização
Balanças	Verificação do zero e leitura com um peso	Diariamente/cada utilização
Destilador, desionizador e unidades de osmose reversa	a) Verificação da condutividade b) Verificação da contaminação microbiológica	a) Semanalmente b) Mensalmente
Diluidores gravimétricos	a) Verificação do peso do volume distribuído b) Verificação da razão de diluição	a) Diariamente b) Diariamente

Tabela B.3 - Guia para Validação do Equipamento e Verificação do Funcionamento (Continuação)

TIPO DE APARELHO	REQUISITOS	FREQUÊNCIA SUGERIDA
Distribuidores de meio	Verificação do volume distribuído	Cada ajustamento ou alteração
Pipetadores / pipetas	Verificar a exactidão e a precisão do volume distribuído	Regularmente (tendo em conta a natureza e a frequência da utilização)
Plaqueadores em espiral	<ul style="list-style-type: none"> a) Estabelecer o funcionamento contra métodos convencionais b) Verificar a condição da ponta e os pontos de início e fim c) Verificar o volume dispensado 	<ul style="list-style-type: none"> a) Inicialmente e anualmente b) Diariamente/cada utilização c) Mensalmente
Contadores de colónias	Comparar com contagem feita manualmente	Anualmente
Jarras de anaerobiose	Verificar com indicador de anaerobiose	Cada utilização
Ambiente do laboratório	Monitorizar a contaminação microbiológica do ar das superfícies usando, por ex., amostradores de ar, placas expostas, placas de contacto ou zaragatoas	Semanalmente
Centrifugas	Verificar contra um taquímetro calibrado	Anualmente

(Adaptado de: Guia Relacre, 2006)

ANEXO C - Utilização de Culturas de Referência

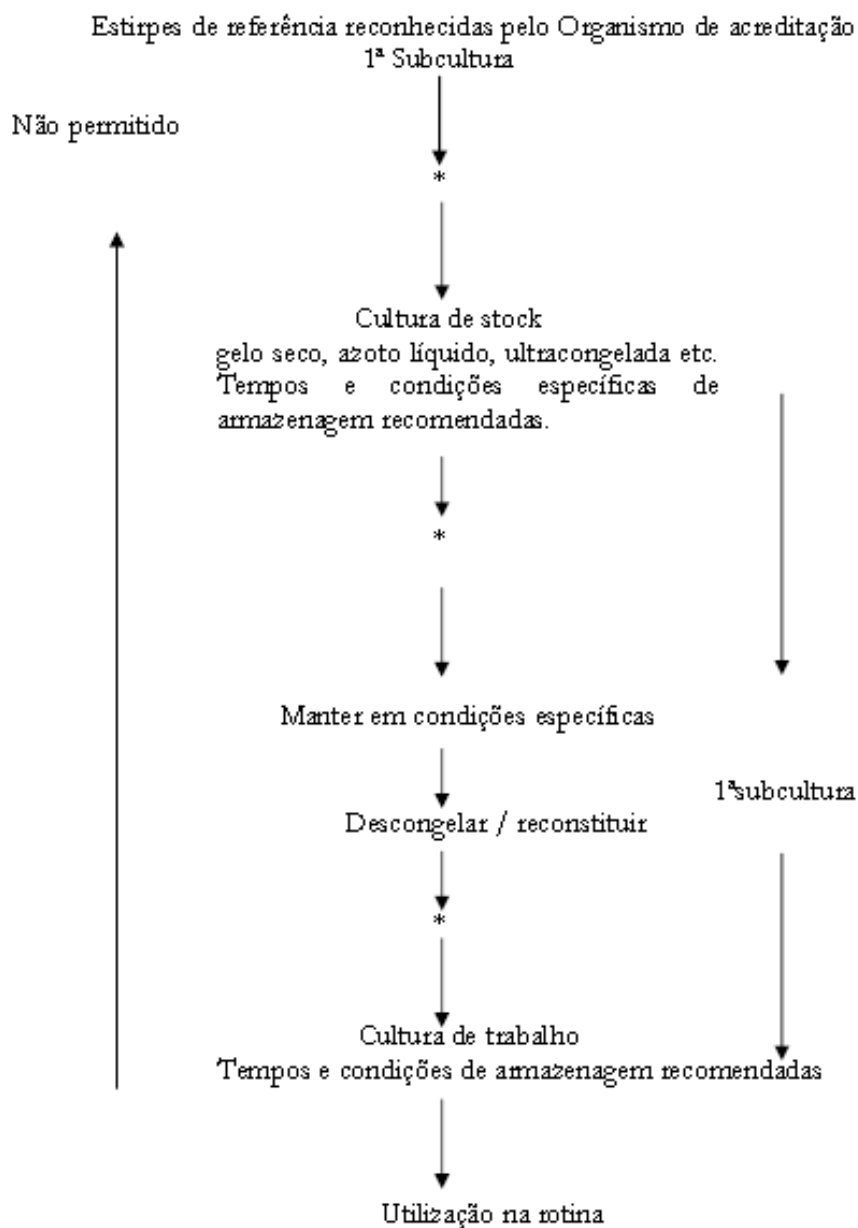


Figura C.1 - Preparação de “stocks” de trabalho, à custa de culturas de referência.
(Adaptado de: Guia Relacre, 2006)

- ✓ Verificações paralelas do grau de pureza e testes bioquímicos sempre que apropriado.
- ✓ Todas as partes do processo devem estar integralmente documentadas e devem ser mantidos os registos detalhados de todas as etapas.

ANEXO D – Metodologia de acordo com a ISO 16266:2008

1 - Identificação da Amostra

Em primeiro lugar deve identificar-se a amostra a ser analisada e definir os volumes a serem filtrados, em função de sua procedência, nomeadamente no caso de águas de piscinas volumes de 100 mL.

2 - Filtração da Amostra e Incubação

- a) Verter cuidadosamente no porta-filtro o volume da amostra a ser examinado, evitando que a água respingue sobre as suas bordas superiores, ligar o sistema de vácuo e proceder à filtração;
- b) Após a filtração, enxaguar o porta-filtro três vezes, com porções de 20-30mL de água de diluição tamponada estéril, para evitar a retenção de alguma bactéria nas paredes internas do mesmo;
- c) Desligar a válvula de controle de vácuo do porta-filtro, ao finalizar a operação;
- d) Evitar a secagem excessiva da membrana filtrante, desligando o vácuo imediatamente após o término do processo de filtração;
- e) Separar a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça, cujas extremidades foram esterilizadas, retirar com cuidado a membrana. Acoplar novamente a parte superior do porta-filtro à inferior;
- f) Obedecendo aos cuidados de assepsia, colocar cuidadosamente a membrana, com a superfície quadriculada voltada para cima, na superfície do meio de cultura contido na placa de Petri, devidamente identificada com o número da amostra e o volume filtrado;
- g) Incubar as placas de Petri a 36 ± 2 °C durante 44 ± 4 horas.

3 - Leitura dos Resultados

- (a) Usar microscópio estereoscópico para contar todas as colónias com cor azul/verde como *Pseudomonas aeruginosa*;
- (b) Contar todas as colónias fluorescentes com cor não azul e não verde e castanho avermelhado como presumíveis de *Pseudomonas aeruginosa*, fazendo de seguida provas de confirmação.

4 - Testes de Confirmação

Das colónias fluorescentes com cor não azul e não verde e castanho avermelhado, repicar pelo menos 5 colónias para meio nutritivo Plate Count Agar (PCA), incubar durante 22 ± 2 horas a 36 ± 2 °C e a partir daqui se existirem colónias isoladas, executam-se as provas de confirmação para:

a) *Colônias Fluorescentes com cor Não Azul e Não Verde. Para as colônias fluorescentes com cor não azul ou não verde, será necessário realizar a prova de produção de amônia, da seguinte forma:*

- i. Repicar para o caldo de acetamida pelo menos 5 colônias (uma em cada tubo);
- ii. Incubar a 36 ± 2 °C durante 22 ± 2 horas;
- iii. Adicionar 1 a 2 gotas de Reagente de Nessler. A reação positiva (produção de amônia) é evidente pela coloração, que dependendo da concentração pode variar entre amarelo e cor tijolo.

b) *Colônias Castanho/ Avermelhado. Na presença de colônias Castanho/Avermelhado, será necessário realizar a prova de pesquisa da oxidase e a prova de pesquisa de fluorescência em pelo menos 5 colônias, da seguinte forma:*

✓ **Prova de Pesquisa da Oxidase:**

- i. Colocar 2 a 3 gotas de Reagente de Oxidase em papel de filtro;
- ii. Espalhar as colônias pelo papel. A reação é positiva sempre que aparece uma cor azul-lilás em 10 segundos.

✓ **Prova de Pesquisa de Fluorescência:**

- i. Repicar pelo menos 5 colônias para meio King B;
- ii. Incubar os tubos a 36 ± 2 °C durante 5 dias e examinar diariamente sob luz U.V. A reação é considerada como positiva sempre que aparece fluorescência em 5 dias.

Para as colônias com oxidase e fluorescência positiva, fazer a prova de produção de amônia. Contar e registrar todas as colônias com reação positiva à oxidase, fluorescência e produção de amônia como *Pseudomonas aeruginosa*.

5 - Interpretação dos Resultados

Em função dos resultados obtidos, pode-se considerar que existe presença de *Pseudomonas aeruginosa* em todas as colônias com cor azul/ verde, todas as colônias fluorescentes com cor não verde/ azul que produzem amônia e todas as colônias castanho/ avermelhado que são oxidase positiva, produzem fluorescência e amônia a partir de acetamida.

6 - Registos

Todos os resultados devem ser devidamente registados numa folha de registo (Anexo E) incluindo sempre as leituras intermédias (provas de confirmação, repicagens, características de colónias, entre outras) para a apresentação do resultado final. As folhas de registo deverão ser rubricadas pelo responsável pela execução da análise e responsável pelas leituras.

7 - Expressão dos resultados

Pesquisa: A pesquisa é dada como “presença” sempre que for detetado e “ausência” sempre que não for detectado, ambas por volume de amostra.

Quantificação: As contagens de *Pseudomonas aeruginosa* são expressas em Unidade Formadoras de Colónias (UFC) por volume de amostra.

8 - Diluições

Os volumes e as diluições das amostras, devem ser escolhidos de modo a que o número de colónias a serem contadas no filtro da membrana se encontre, se possível, entre 20 e 80. Para alguns tipos de água, pode ser vantajoso realizar uma filtração de uma seleção de diferentes volumes de amostra de modo a que o número de colónias em pelo menos um dos filtros da membrana, se enquadre nesta range. Para águas tratadas, filtrar 100 mL da amostra. Para águas poluídas ou filtrar volumes menores, ou diluir a amostra com uma solução diluente de recuperação antes da filtração.

ANEXO E- Registos *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela E.1 – Folha de Registo de Resultados

0	0	Vol. ou Dil.	N. colónias em CN (verde/azul)	Res. Data/Rub	N. colónias típicas em CN (castanho/ avermelhado)	Teste Oxidase (+) (azul/lilás)	Teste Fluorescência (+)	Teste de Amónia (de amarelo a tijolo)	Res. Data/Rub	N. colónias típicas em CN (Fluorescentes não verdes e não azuis)	Teste de Amónia (de amarelo a tijolo)	Res. Data/Rub	Res. Final Data/Rub
Branco													
Controlo positivo CN <i>P.aeruginosa</i> (___ / ___)*													
Controlo negativo CN <i>E. faecalis</i> (___ / ___)*													
Controlo negativo Oxidase <i>E.coli</i> (___ / ___)*													
Controlo negativo Fluorescência <i>E.coli</i> (___ / ___)*													
Controlo negativo Amónia <i>E.coli</i> (___ / ___)*													
MR (<i>P.aeruginosa</i>)													
Contagem em Duplicado													
ID: _____													
Ensaio em Paralelo													
ID: _____													
Amostra Real 1													

Tabela E.1 – Folha de Registo de Resultados (Continuação)

0	0	Vol. ou Dil.	N. colónias em CN (verde/azul)	Res. Data/Rub	N. colónias típicas em CN (castanho/ avermelhado)	Teste Oxidase (+) (azul/lilás)	Teste Fluorescência (+)	Teste de Amónia (de amarelo a tijolo)	Res. Data/Rub	N. colónias típicas em CN (Fluorescentes não verdes e não azuis)	Teste de Amónia (de amarelo a tijolo)	Res. Data/Rub	Res. Final Data/Rub
Amostra Real 2													
Rastreabilidade	CN	Lote		Amostras									
	Gelose Simples												
	Oxidase												
	Fluorescência												
	Amónia												
	Reagente Nessler												

LEGENDA: Vol.-Volume; Dil.-Diluição; Rub.-Rúbrica; Res.-Resultado; MR-Material de referência; ID - Colheita; * - Data reconstituição da lenticula ou da repicagem para meio fresco

