

VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ENSAIO MICROBIOLÓGICO, UTILIZADO NA DETECÇÃO DE LISTERIA MONOCYTOGENES.

Lima, S.C.R. (UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO) ; Friedrich, M.T. (UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO)

RESUMO

Esta pesquisa teve por objetivo geral validar o procedimento de determinação da *Listeria monocytogenes* em alimentos pelo método Bax®, utilizado pelo laboratório de microbiologia do Cepa (Centro de Pesquisa em Alimentos), da UPF (Universidade de Passo Fundo), levando em conta parâmetros exigidos pelo Inmetro (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) e pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), através da ISO/IEC 17025:2005. Para tanto, foi analisada uma amostra de queijo, em 10 repetições, por quatro analistas diferentes, em replicata, pelo método em questão e também por um método de referência.. Também seguiu-se nos ensaios um branco. Conseguiu-se validar não apenas o método Bax®, mas também o método da ISO 11290-1:1996.

PALAVRAS CHAVES

validação; PCR; Listeria monocytogenes

INTRODUÇÃO

Os alimentos são facilmente contaminados com microrganismos, na natureza, durante a manipulação e no processamento. Se esses microrganismos tiverem condições de crescer, podem mudar as condições dos alimentos e também, poder ser responsáveis por intoxicações e infecções transmitidas através deles (PELCZAR et al., 2005, p. 222). O conhecimento cada vez maior da transmissão de doenças através dos alimentos, tem determinado que um número crescente de países considere a necessidade de submetê-los a provas, que confirmem sua qualidade (SILVA, 2002). Já que, segundo Koneman (1999, p. 71) os microrganismos precisam encontrar uma porta de entrada para instalar-se em algum hospedeiro, e causar os seus malefícios, deve-se considerar os alimentos como veículos facilitadores de acesso a essa porta de entrada. Além de possuir técnicas para detecção de microrganismos, a fim de garantir a segurança alimentar, os laboratórios prestadores de serviço ou particulares, devem garantir que seus métodos são eficientes e atendem aos requisitos a que se propõem (INMETRO, 2011). No Brasil há duas agências credenciadoras, responsáveis por avaliar a competência de laboratórios de ensaios, o Inmetro e a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), elas determinam que para essa garantia de qualidade, os métodos devem passar por um processo chamado de validação (RIBANI et al., 2004). Métodos normalizados, como os de compêndios, já são métodos validados e não é necessário efetuar uma validação completa, desde que não ocorram variações significativas do mesmo (USP 25, 2002 apud BARROS, 2002). Os parâmetros a serem utilizados devem ser definidos depois de conhecido o método e as condições em que ele será utilizado, seguindo as resoluções e orientações dessas agências (RIBANI et al., 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização dos ensaios, foi utilizado como matriz o alimento queijo, que foi obtido pelo laboratório de microbiologia do Cepa, da UPF. Para fins de obter os resultados necessários, foi analisada uma amostra em 10 repetições, por quatro analistas diferentes, em replicata. Também seguiu-se nos ensaios um branco. As repetições aconteceram em dias diferentes, variando-se equipamentos e lotes de meios de cultura. Para os ensaios dos dois métodos, foram utilizadas as matrizes artificialmente contaminadas, com um número conhecido de microrganismos alvo e também de microrganismos interferentes. A cepa do microrganismo alvo utilizada foi a de *Listeria monocytogenes*, sua contagem em todas as fortificações mantiveram-se entre 10 e 50 UFC (unidades formadoras de colônia)/mL. As cepas de microrganismos interferentes são as seguintes: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Enterococcus faecalis*,

Escherichia coli e *Enterobacter aerogenes*. A contagem de todos os interferentes juntos, ficou na faixa de 10000 a 100000 UFC/mL. A realização dos ensaios, e também a utilização dos bioquímicos seguiram as instruções da ISO 11290-1:1996 alteração 1:2004. Microbiologia de alimentos e alimentação animal - Método horizontal para a detecção e enumeração de *Listeria monocytogenes* - Parte 1 método de detecção (ISO, 2004), assim como para a execução do método BAX® orientou-se pelo Manual do Usuário de análise em PCR com detecção automatizada, fornecido pela DuPont Qualicon (2005). Os resultados obtidos, tendo em vista que os métodos oferecem resultados qualitativos, foram avaliados a nível de percentual de concordância, sendo que o nível aceito como satisfatório foi de 95%. Os parâmetros avaliados foram seletividade, repetibilidade e precisão intermediária.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizou-se a interpretação dos resultados em função de concordâncias, desconsiderando os brancos realizados. A seletividade deve avaliar quanto a metodologia é indiferente a presença de interferentes, na determinação do analito, por isso as comparações foram feitas com todas as 10 amostras em replicata, ou seja para os 20 resultados, com o microrganismo alvo e também com os 6 microrganismos interferentes. Os dois métodos mostraram-se seletivos, tendo em vista que conseguiram detectar em 19 das 20 amostras analisadas o analito, mesmo na presença de um número aproximadamente 1000 vezes maior de microrganismos interferentes, em relação ao microrganismo alvo. Demonstrando um nível de 95% de concordância. Para a repetibilidade os resultados avaliados são de análises realizadas sobre as mesmas condições de repetibilidade. Foram avaliados os resultados de um mesmo analista, que realizou os ensaios em um mesmo dia, utilizando os mesmos equipamentos e os mesmos lotes de meios de cultura. Os dois métodos conseguiram satisfazer ao parâmetro de repetibilidade, tendo em vista que o analista em questão, conseguiu identificar 6 presenças das 6 existentes. Demonstrando um nível de 100% de concordância. Para a precisão intermediária, foram observados os níveis de concordância entre as repetições dos quatro analistas diferentes, realizadas em dois dias diferentes, variado equipamentos e lotes de meios de cultura. Os dois métodos conseguiram satisfazer ao parâmetro da precisão intermediária, tendo em vista que foram encontradas 19 das 20 presenças. Demonstrando um nível de 95% de concordância. Os três parâmetros que puderam ser estudados apresentaram-se conforme as especificações desejadas.

CONCLUSÕES

Como os dois métodos já são normalizados, podem ser considerados validados apenas com a avaliação destes parâmetros. conseguiu-se, portanto validar não apenas o método Bax®, mas também o método da ISO 11290-1:1996, que passará também a ser utilizado pelo laboratório da realização da pesquisa na prestação de serviço. Pode-se considerar que o objetivo principal desta pesquisa foi atingido, o método está confirmado e aprovado para o uso pretendido, contribuindo para o aperfeiçoamento da formação acadêmica e também do sistema de qualidade já existente no Laboratório de Microbiologia do CEPA.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora MSc. Maria Tereza Friedrich, e a toda equipe do Laboratório de Microbiologia do Cepa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

DUPONT/QUALICOM. Sistema BAX®, Análise em PCR com detecção automatizada – Manual do Usuário, E.U.A., 2005.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acessado em: 19 maio. 2012.

ISO 11290-1:1996 amendment 1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1 Detection method.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. Diagnóstico microbiológico. São Paulo, Ed. 5, Panamericana, 1999.

PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; EDWARDS, D. D.; PELCZAR, M. F. Microbiologia: Conceitos e Aplicações. São Paulo, Ed. 2, Pearson, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. Química Nova. São Paulo. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scieo.php?p id=S0100-0422004000500017&script=sci_arttext>. Acessado em: 04 jul. 2012.

SILVA, M. C. Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema Simplate. 2002. Dissertação (Mestrado em ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-29102002-161542/pt-br.php>>. Acessado em: 04 jul. 2012.

USP 25, apud BARROS, C. B.; Validação de métodos analíticos. Biólogo, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 175 - 177, jul./dez., 2002. Disponível em: <http://www.faccamp.br/apoio/luciana_bizeto/aula1-artigo1.pdf> Acessado em: 06 jul. 2012.