

## Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares

## Validation of qualitative alternative methods in the detection of food-born pathogens

Elaine Ibrahim de Freitas<sup>1</sup>  
Anderson Almeida de Lemos<sup>1</sup>  
Victor Augustus Marin<sup>1,2</sup>

**Abstract** *Food-Born Diseases (FBD) are a considered an important hazard for human health and the economy on individual, family and national level. The risk of dissemination of pathogens increases continuously and microbiological quality control programs are employed in the entire food chain in order to minimize the risk of infection and/or intoxication. The use of alternative methods for the detection of microorganisms is one of the tools for granting the microbiological safety of the products. For obtaining reliable results however the method needs to be validated. The purpose of the validation is to ensure through experimental studies that the method is meeting the requirements of analytical applications, ensuring the reliability of results and adequate levels of accuracy, precision, detection limit, solidity, repeatability, reproducibility, specificity, linearity and exactness. Although there are some guides describing the validation of analytical methods, comparatively little has been said regarding validation of microbiological methods and even less with respect to molecular methods. The aim of this work is to review the parameters necessary for validating qualitative alternative methods in the detection of food-born diseases.*

**Key words** *Validation, Food-born diseases, FBD*

**Resumo** *As Doenças de Origem Alimentar (DOA) são um perigo de grande relevância para a saúde humana e para a economia dos indivíduos, famílias e nações. O risco de disseminação de microrganismos patogênicos vem crescendo continuamente, e programas de controle de qualidade microbiológica são empregados em toda a cadeia de produção alimentar a fim de minimizar o risco de infecção e/ou intoxicação. A utilização de métodos de detecção alternativos de microrganismos é uma das ferramentas que podem ser utilizadas para garantir a segurança microbiológica dos produtos. Contudo, para que a metodologia utilizada forneça resultados confiáveis é necessário que ela seja validada. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados, devendo apresentar níveis adequados de acurácia, precisão, limite de detecção, robustez, repetitividade, reprodutibilidade, especificidade, linearidade e exatidão. Embora existam diversos guias descrevendo a validação de métodos analíticos, comparativamente, pouco se tem dito a respeito da validação de métodos microbiológicos e, menos ainda, de métodos moleculares. O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão dos parâmetros necessários para validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares.*

**Palavras-chave** *Validação, Doenças de Origem Alimentar, DOA*

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fiocruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900 Rio de Janeiro RJ. vicmarin@incqs.fiocruz.br  
<sup>2</sup> Bolsista Prodoc - CAPES.

## Introdução

As Doenças de Origem Alimentar (DOA) são um perigo de grande relevância para a saúde humana e para a economia dos indivíduos, famílias e nações<sup>1</sup>. Com o aumento de viagens e comércio internacionais nos últimos anos, o risco de disseminação de microrganismos patogênicos vem crescendo continuamente, e programas de controle de qualidade microbiológica são empregados em toda a cadeia de produção alimentar a fim de minimizar o risco de infecção para o consumidor<sup>2</sup>.

Neste cenário, o setor de controle de qualidade das empresas é dotado de atribuições e ferramentas capazes de interromper um processo em desacordo com as especificações, ou prevenir eventos graves, como uma infecção ou intoxicação alimentar veiculada por alimentos industrializados<sup>3</sup>. A utilização de métodos de detecção de microrganismos em alimentos é uma dessas ferramentas usadas para garantir a segurança microbiológica dos produtos. Mas como garantir resultados confiáveis? A resposta está na validação da metodologia utilizada.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), conforme a RDC 210, validação é um ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente leve aos resultados esperados<sup>4</sup>. De acordo com a RE 899, de 29 de maio de 2003, da Anvisa, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e limite de detecção e exatidão adequados à análise<sup>5</sup>. É importante ressaltar que todos os equipamentos e materiais devem se apresentar devidamente calibrados, e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados<sup>5</sup>.

Os laboratórios de análise devem realizar a validação de métodos para atender ao governo ou a órgãos regulamentadores, sendo que os dados obtidos farão parte do conjunto de informações que serão apresentadas a agências como o Food and Drug Administration<sup>6</sup> ou à Anvisa.

Embora existam diversos guias descrevendo a validação de métodos analíticos, comparativamente, pouco se tem dito a respeito da validação de métodos microbiológicos, e menos ainda, de métodos moleculares, categorizados segundo a Association of Official Analytical Chemists (AOAC)<sup>7</sup> como métodos alternativos.

Os métodos clássicos de detecção de bactérias em alimentos envolvem etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, seguidos por testes de identificação morfológica, bioquímica e imunológica. Apesar de serem eficientes, bem estabelecidos e de requererem materiais de consumo mais baratos, tais procedimentos apresentam algumas desvantagens, como o trabalho intenso e a espera por vários dias pelos resultados<sup>8</sup>. Além disto, propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser sempre expressadas, dificultando sua interpretação e classificação<sup>2</sup>.

A introdução da reação em cadeia da polimerase (em inglês, Polymerase Chain Reaction – PCR) em diagnósticos microbiológicos tem sido estabelecida em pesquisas laboratoriais como uma valiosa alternativa para os métodos tradicionais. Rapidez, bom limite de detecção, seletividade e potencial para otimização são as maiores vantagens deste método. Entretanto, existem algumas variáveis a serem consideradas no uso da PCR, como o custo do alto investimento tecnológico, a necessidade de aprovação oficial e regulamentos e instruções padronizadas<sup>2</sup>.

Segundo Hoorfar *et al.*<sup>9</sup>, as dificuldades para a reprodução de testes publicados, devido à variação no desempenho dos termocicladores, na eficiência das diferentes polimerases e na presença de inibidores da PCR na matriz da amostra, têm dificultado a implementação pelos laboratórios, particularmente aqueles com programas de garantia da qualidade. É necessário ter métodos baseados em PCR que sejam utilizados como padrões reconhecidos internacionalmente<sup>10, 11</sup>.

A falta de padrões internacionais obriga os laboratórios a gastar recursos substanciais na adaptação dos testes publicados. Contudo, muitos kits de PCR comerciais são utilizáveis, e é importante para os laboratórios de rotina e laboratórios de referência ter acesso a PCR com fórmulas abertas, não comerciais e não patenteadas, nas quais as informações dos genes-alvo e dos reagentes estejam completamente disponíveis.

O pré-requisito para que um método baseado em PCR, publicado em literatura científica, seja adaptado como um padrão é não ser patenteado e ser validado por intermédio de um estudo colaborativo multicêntrico e de acordo com os critérios internacionais<sup>10, 12, 13</sup>. Estudos de validação multicêntricos de PCRs, não comerciais, para a detecção de microrganismos patogênicos zoonóticos têm sido realizados pelo projeto de validação e padronização europeu envolvendo 35 laboratórios de 21 países<sup>2, 14</sup>.

Devido à falta de validação internacional e protocolos padronizados, assim como a qualidade dos reagentes e equipamentos, o método não validado produz resultados inconsistentes entre peritos e laboratórios. Por exemplo, muitos conjuntos de iniciadores (*primers*) que são utilizados para a amplificação *in vitro* do DNA da bactéria *Salmonella* pela PCR diferem em seus limites de detecção e acurácia<sup>15-18</sup>. Em alguns casos, a coleção de cepas utilizada na validação não inclui todas as subespécies conhecidas de *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* e perde, epidemiologicamente, importantes isolados. Além disto, um controle interno de amplificação, necessário para indicar resultados falso-negativos causados por inibidores da PCR, é raramente incluído no teste diagnóstico final.

Segundo Malorny *et al.*<sup>2</sup>, o desenvolvimento de métodos baseados em PCR padronizados para detecção de patógenos alimentares pode ser implementado por intermédio de cinco estágios:

1) Revisão de métodos baseados em PCR e avaliados para a detecção do microrganismo desejado;

2) Avaliação das técnicas de preparação das amostras com referência à matriz utilizada;

3) Comparação experimental dos métodos baseados em PCR revisados no estágio 1, ou um subconjunto deste, com deferência ao desempenho para uso diagnóstico;

4) Validação do método que obteve o melhor desempenho no estágio 3 em vários laboratórios, em comparação com os testes-padrão convencionais, para determinar sua reprodutibilidade. Neste estágio, são recomendáveis a elaboração de guias e a organização de treinamentos;

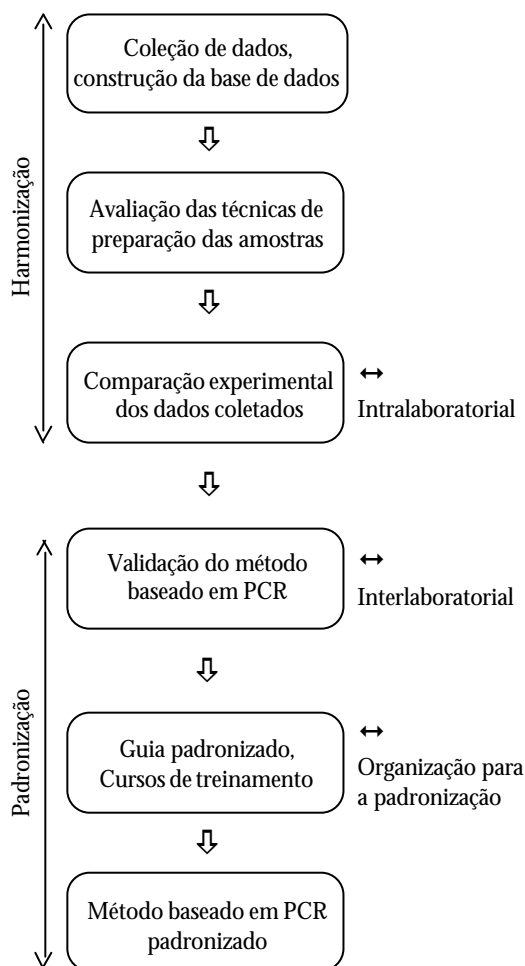
5) Preparação de padrões de acordo com os formatos aceitos por organizações internacionais, como o European Committee for Standardization (CEN), a Association of Official Analytical Chemists (AOAC) ou o International Organization for Standardization (ISO).

Além disto, estes estágios podem ainda ser subdivididos nos estágios de harmonização e padronização propriamente ditos (Figura 1).

### Crítérios para a padronização do PCR diagnóstico

Segundo Malorny *et al.*<sup>2</sup>, um método baseado em PCR, padronizado para a detecção de patógenos alimentares, deve cumprir os seguintes critérios:

Figura 1  
Estágios de harmonização e padronização<sup>2</sup>.



### Acurácia analítica e diagnóstica

O método baseado em PCR deve ter um alto grau de acurácia analítica e diagnóstica. A acurácia analítica abrange a seletividade e o limite de detecção. Conseqüentemente, a seletividade do método baseado em PCR compreende a inclusividade e a exclusividade.

A acurácia diagnóstica considera os microrganismos desejados e os microrganismos não desejados na presença da matriz biológica e inclui os termos especificidade e sensibilidade. A especificidade diagnóstica é definida como o grau de medida do quanto o método é afetado por componentes não desejados presentes na matriz biológica, que resulta em falso-negativos. A sensibilidade diagnóstica é definida como a medida do

grau de detecção de microrganismos patógenos desejados na matriz biológica.

Um alto grau de acurácia diagnóstica significa, portanto, detectar verdadeira e precisamente o microrganismo desejado na presença da matriz biológica, sem a interferência de componentes não desejados.

Segundo Schulten *et al.*<sup>19</sup>, a acurácia de um método analítico é definida como a proporção de correspondência entre o valor determinado do analito e o valor verdadeiro. O método utilizado deve ser apropriado à matriz. Contudo, a acurácia pode ser medida de diferentes maneiras:

1) Analisando uma amostra com uma concentração conhecida e comparando o valor medido com o “valor verdadeiro”. Todavia, um padrão de referência deve ser utilizado;

2) Por meio de um placebo reforçado com o constituinte ativo – método de recuperação. Neste método, uma quantidade conhecida do constituinte ativo é adicionada a uma formulação denominada branco (amostra que contém todos os ingredientes, exceto o ativo). A mistura é analisada, e os resultados obtidos são comparados com o resultado esperado;

3) Método Padrão de Adição: uma amostra é analisada e, posteriormente, uma quantidade conhecida do constituinte ativo puro é adicionada. Em seguida, a amostra é novamente analisada. A diferença entre os resultados das duas análises é comparada com o resultado esperado.

A acurácia diagnóstica pode também ser definida como o grau de correspondência entre a resposta obtida por PCR e a resposta obtida pelo método de referência em amostras idênticas. Acurácia diagnóstica é, portanto, igual às amostras positivas para a PCR e o método de referência, mais as amostras negativas para a PCR e o método de referência dividido pelo número total de amostras<sup>20</sup>.

#### Limite de detecção

O método baseado em PCR deve ter um baixo (bom) limite de detecção. Padrões internacionais derivados de métodos tradicionais requerem um limiar de detecção de uma célula por 25 gramas de amostra. O limite de detecção teórico de uma célula microbiana por reação de PCR pode ser traduzido na prática em  $10^3$ - $10^4$  células por mL de amostra pré-enriquecida. Um pequeno volume da matriz inicial é usado na reação de PCR. Por esta razão, a análise por PCR é usualmente precedida por uma etapa de enriquecimento para se obter uma multiplicação de células bac-

terianas. A PCR deve detectar ao menos 10-100 cópias do DNA desejado. Além disto, o limite de detecção deve ser determinado em relação ao cálculo da probabilidade de detecção<sup>21</sup>. Sendo assim, a frequência relativa esperada de respostas positivas da PCR para várias concentrações de ácidos nucleicos ou células deve ser estabelecida.

#### Robustez

O método deve ser tolerante com relação a vários parâmetros físicos e químicos. Os parâmetros usualmente mais críticos são a qualidade do DNA molde (*template*) – integridade física do cromossomo e ausência ou presença de inibidores da PCR – e uma série de diferenças na pureza dos reagentes, erros de pipetas, acurácia nas temperaturas alcançadas durante a PCR, adequação do tempo de duração de cada etapa da PCR e taxa de alteração (*ramping rates*) entre diferentes temperaturas durante a amplificação. Um recente estudo interlaboratorial demonstrou claramente a variação significativa no desempenho do termociclador no resultado do diagnóstico obtido por PCR<sup>22</sup>. Portanto, a alta robustez de um método é uma boa indicação de uma alta reprodutibilidade interlaboratorial. Contudo, os instrumentos utilizados (termociclador, pipetas, etc.) devem ser checados rotineiramente para um bom desempenho, e os reagentes (microtubos, nucleotídeos, enzima polimerase, água, por exemplo) devem ser de uso adequado à biologia molecular.

#### Controles de amplificação

A robustez de um método de PCR pode ser monitorada pelo uso de controle positivo e reagente de teste (negativo) nas reações. A presença de inibidores da PCR pode ser monitorada pelo uso de um apropriado controle interno de amplificação (CIA) em cada reação.

Um CIA é uma seqüência de DNA não-alvo presente no tubo da reação, o qual é co-amplificado simultaneamente com a seqüência-alvo. Na PCR sem um CIA, uma resposta negativa (sem banda ou sinal) pode significar que não há presença da seqüência-alvo na reação, mas também pode significar que a reação foi inibida, como um resultado de mau funcionamento do termociclador, preparação incorreta da mistura da PCR, baixa atividade da polimerase e presença de substâncias inibidoras na matriz da amostra.

Em uma PCR com um CIA, um sinal de controle vai ser sempre produzido quando existir uma seqüência não-alvo presente. Quando não há pro-

dução do sinal do CIA nem do sinal do alvo, a reação da PCR falha. Então, quando usarmos um método baseado em PCR na análise de rotina, um CIA irá indicar resultados falso-negativos se a concentração estiver ajustada corretamente. Isto é, resultados falso-negativos tornam-se um perigo para a população, enquanto que resultados falso-positivos somente requerem um esclarecimento dos resultados presuntivos por intermédio de um novo teste na amostra. O European Standardization Committee (CEN), em colaboração com o International Standard Organization (ISO), tem proposto um guia geral para testes de PCR que requerem a presença do CIA na mistura da reação<sup>12</sup>. Conseqüentemente, somente PCRs contendo CIA podem ser submetidos a estudos colaborativos multicêntricos, que são um pré-requisito para a padronização<sup>9</sup>.

#### Contaminação

Um método baseado em PCR deve carrear um risco mínimo de contaminação. Para minimizar este risco, práticas como o uso de áreas de trabalho separadas, a diminuição do número de etapas com pipetas e o uso de ponteiros com filtros devem ser adotadas.

#### Flexibilidade com respeito às várias matrizes da amostra

Os maiores impedimentos no diagnóstico pela PCR e, em particular, na determinação do limite de detecção são o processo de pré-preparo da PCR e a necessidade de flexibilidade com respeito à aplicabilidade de várias matrizes. Todavia, o método baseado em PCR padronizado pode incluir vários métodos de preparação de amostras objetivando:

- 1) Concentrar microrganismos-alvo;
- 2) Superar os efeitos das substâncias inibidoras da PCR;
- 3) Reduzir a heterogeneidade biológica da amostra para homogeneizar amostras compatíveis com a PCR, a fim de garantir variações entre as matrizes.

Contudo, diversas técnicas de preparação de amostras são muito complicadas, exigindo tempo em excesso, além de não apresentarem confiabilidade.

#### Aceitação pelos laboratórios

Se alguns benefícios do método padronizado devem ser obtidos, estes surgirão por intermédio

da larga disseminação, aceitação e adoção destes métodos. Além disso, há necessidade de o método para diagnóstico baseado em PCR ser validado, e para isto é importante que nem o método nem os reagentes sejam restritos para o uso público ou patenteados.

Outro fator importante é que o método deve ser apresentado de forma clara e acompanhado de fáceis e acessíveis protocolos para aplicação e interpretação.

#### Limites para a harmonização

Existem vários fatores que podem afetar os esforços para a harmonização da PCR:

- 1) A qualidade de todos os seus componentes, incluindo o DNA-molde originado do preparo da amostra para PCR;
- 2) As condições da reação;
- 3) O sistema de detecção utilizado;
- 4) O equipamento utilizado;
- 5) O ambiente (temperatura, umidade, limpeza química e microbiológica);
- 6) Prática do analista.

Todos estes fatores devem ser considerados no desenvolvimento da PCR harmonizada. Todavia, é quase impossível comparar todos os tipos de reagente, sistemas-tampão e equipamentos, com respeito aos seus efeitos na eficiência da amplificação.

A comparação de conjuntos de iniciadores deve ser efetuada com um único sistema de tampão e polimerase, e todos os outros componentes e equipamentos devem ser os mesmos. Uma lista de cepas de referência deve ser primeiramente definida para o teste de seletividade dos conjuntos de iniciadores. Isto deve incluir as cepas epidemiologicamente mais importantes do organismo-alvo e uma lista de cepas pertencentes a espécies relacionadas ou sorotipos que podem não ser detectados pelos iniciadores.

O protocolo para harmonização de conjuntos específicos de iniciadores deve ser principiado com condições típicas da PCR utilizando a polimerase: ser determinada a seletividade dos conjuntos de iniciadores selecionados com o DNA isolado das cepas relevantes; testar a probabilidade de detecção dos conjuntos de iniciadores mais seletivos com diferentes quantidades de DNA; se necessário, otimizar o resultado da PCR com uma alta probabilidade de detecção; testar novamente a seletividade do conjunto de iniciadores para verificar as condições da PCR quando alteradas; se a seletividade diminuir, escolher um segundo

conjunto de iniciadores e começar o procedimento novamente?<sup>2</sup>

### Infra-estrutura e qualificação do laboratório microbiológico

Segundo Amara<sup>3</sup>, a implantação do laboratório destinado às análises microbiológicas deve prever um local dedicado às suas diversas atividades. O laboratório de microbiologia deve contar com, pelo menos, áreas de lavagem de materiais e descarte, de preparo de materiais, de meios e reagentes, de esterilização, de inoculação, de leituras e incubação, além da área de estudo e administrativa. As áreas citadas devem estar equipadas com fluxo laminar, autoclave, estufa para incubação, microscópio, estufa para secagem de material, destilador ou um sistema capaz de produzir água purificada e refrigerador.

### Capacitação de pessoal

O treinamento é essencial para garantir a confiabilidade dos resultados e assegurar o bom desempenho dos técnicos e analistas. A estes devem ser repassados os conhecimentos específicos sobre rotinas analíticas e sobre o preparo de materiais e insumos necessários para a prática laboratorial.

### Teste de proficiência

A participação em testes de proficiência tem se tornado sistemática para os laboratórios nos últimos anos, principalmente para os oficiais. Vários esquemas de proficiência são desenhados para avaliar resultados qualitativos, assim como capacidades analíticas quantitativas. Diversos programas de testes de proficiência têm sido estabelecidos em todo o mundo, com os objetivos de: identificar áreas com problemas como instrumentação obsoleta no laboratório; prover experiência para os analistas participantes e ajudar com a implementação de práticas de controle de qualidade.

Em contraste com o estudo de validação, o programa de teste de proficiência não especifica que método será utilizado na determinação dos resultados; ou seja, a escolha do método é feita pelo laboratório. Todavia, o uso de métodos validados é uma obrigação de laboratórios acreditados. Esses testes são valiosas ferramentas para avaliar o desempenho analítico do laboratório. Os

organizadores do programa de proficiência preparam somente os materiais de teste, garantindo que estes sejam uniformes. Os materiais de teste que serão analisados deverão ser enviados aos laboratórios participantes como um material estável e uniforme, com composição e contaminação conhecida, garantindo então que esses resultados possam ser seguramente comparáveis com um valor de referência. Contudo, materiais naturalmente contaminados também podem ser usados<sup>23</sup>.

Os resultados dos testes dos laboratórios participantes retornam para o coordenador do teste de proficiência, juntamente com as informações sobre o método utilizado, sobre a calibração dos equipamentos, etc. O desempenho dos laboratórios participantes é então avaliado pela comparação dos resultados com o “valor verdadeiro” (material reforçado) ou pela combinação dos resultados de todos os laboratórios (aproximação relativa). No caso de testes para investigar as capacidades qualitativas, o número de falso-positivos e falso-negativos serve de base para a avaliação do desempenho<sup>23</sup>.

Portanto, para a PCR, não pode ser dado o status diagnóstico sem antes incluir, como um mínimo, um controle interno de amplificação, um controle positivo (ácido nucléico do microrganismo alvo), um controle negativo (ácido nucléico de microrganismo não-alvo), um controle para os reagentes ou “blank” (contém todos os reagentes, menos ácido nucléico), um controle contendo a mistura de reagentes sem ácido nucléico, para verificar a contaminação de DNAs no ambiente, e de três a quatro amostras contendo concentrações-padrão de números de cópias conhecidas de DNA em diluições 10X, em série acima do limite de detecção<sup>20</sup>.

### Definições segundo Feldsine *et al.*<sup>7</sup>

**Validação:** É um conjunto de operações necessárias para demonstrar que um procedimento é adequado para a aplicação pretendida. Ou, ainda, a validação é composta por duas fases: um estudo em que o diagnóstico do método baseado na PCR é comparado com um método de referência (métodos de detecção de patógenos alimentares baseados em meios tradicionais, por exemplo) usando amostras de alimentos contaminadas artificialmente ou naturalmente e um estudo interlaboratorial.

**Validação de um método alternativo:** Demonstração de que adequada confiança é conse-

guida quando os resultados obtidos pelo método alternativo são comparados àqueles obtidos usando o método de referência, por meio de critérios estatísticos contidos no protocolo de validação aprovado.

**Método de referência:** Dado em ordem de prioridade, os procedimentos de cultura de referência da AOAC, Food and Drug Administration/Bacteriological Analytical Manual (FDA/BAM) ou United States Department of Agriculture (USDA) aplicáveis para a análise do tipo de analito ou de amostra que o método alternativo pretende detectar. Outros métodos reconhecidos internacionalmente também podem ser utilizados como métodos de referência e considerados caso a caso.

**Método alternativo:** É o método de análise que demonstra ou estima, para uma dada categoria de produtos, o mesmo analito como é medido por intermédio do método de referência correspondente. Pode ser próprio ou não comercial e não precisa envolver todo o procedimento de análise, que compreende desde a preparação das amostras até os resultados do teste.

**Método qualitativo:** Método de análise que responde tanto pela presença quanto pela ausência do analito detectado diretamente (enumeração em uma massa ou volume, por exemplo) ou indiretamente (cromatografia ou impedância, por exemplo) em uma determinada quantidade de amostra.

**Método quantitativo:** Método de análise que responde pela quantidade do analito medido diretamente (enumeração em uma massa ou volume, por exemplo) ou indiretamente (cromatografia ou impedância, por exemplo) em uma determinada quantidade de amostra.

**Cultura de referência:** Culturas de microrganismos obtidas de coleções nacionais reconhecidas.

**Estoques de referência:** Culturas de referência mantidas pelo laboratório.

**Precisão relativa:** O grau de correspondência entre os resultados do método sob avaliação e aqueles obtidos usando método de referência reconhecido, assim como aqueles fornecidos pelo National Standards Organisation, pelo International Organization for Standardisation (ISO) ou por uma organização de comércio própria, como, por exemplo, International Dairy Federation (IDF).

**Culturas de estoque:** Culturas de microrganismos derivadas das culturas de referência para serem utilizadas no dia-a-dia.

**Limite de detecção:** Representa o número

mais baixo de microrganismos em exame que pode ser detectado com certo limite de confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental.

**Limite de determinação:** Representa o número mais baixo de organismos com variabilidade definida, que pode ser determinado sob condições experimentais pelo método analisado.

**Repetitividade:** É o grau de concordância entre os resultados das análises individuais, quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises da mesma amostra homogênea, em condições idênticas.

**Reprodutibilidade:** É o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição.

**Taxa de recuperação:** O critério de validação é satisfeito quando um conjunto comum de amostras rende um número parcial de determinações positivas e um número parcial de determinações negativas, neste mesmo conjunto de amostras. A proporção de amostras positivas deve ser de aproximadamente 50% do total de amostras do conjunto.

**Amostra:** É a matriz a ser analisada.

**Analito:** É o componente medido pelo método de análise. No caso de métodos microbiológicos, é o microrganismo ou seus produtos associados (por exemplo, enzimas ou toxinas).

**Linearidade:** Em um procedimento analítico, representa sua capacidade de gerar resultados diretamente proporcionais às concentrações da substância em exame, dentro de um intervalo conhecido.

**Exatidão:** A exatidão de um procedimento analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência.

**Inclusividade:** É a detecção do microrganismo desejado de uma grande variedade de cepas<sup>2</sup>. Segundo Feldsine *et al.*<sup>7</sup>, inclusividade ou sensibilidade é a habilidade de um método alternativo para detectar o analito alvo em uma grande quantidade de cepas.

**Exclusividade:** É a deficiência na resposta de uma relevante variedade de cepas intimamente relacionadas, mas não desejadas<sup>2</sup>. Segundo Feldsine *et al.*<sup>7</sup>, exclusividade ou especificidade é a perda de interferência de um método alternativo de uma relevante variação de cepas não-alvo, que são potenciais reações cruzadas.

**Valores aberrantes:** São aqueles que não fazem parte da população de valores gerados durante as etapas de validação do método.

Homo/heterocedasticidade: Independência/dependência, respectivamente, da variância das repostas do método com as concentrações das amostras analisadas.

Precisão intermediária: Medida do erro aleatório expressado pela dispersão obtida em uma série de medidas repetidas, realizadas em dias diferentes.

Teste de robustez: Submeter o método alternativo proposto a pequenas modificações no procedimento ou a fatores ambientais para determinar que influência eles têm no processo. Também pode ser utilizado para medir diferenças analíticas no mesmo laboratório que podem resultar em modificações nas condições operacionais e ambientais.

Seletividade/Especificidade: É a medida do grau de resposta de amostras puras dos microrganismos desejados e dos microrganismos não desejados<sup>2</sup>. É definida também como a habilidade da PCR para não detectar o microrganismo quando ele não é detectado pelo método de referência; ou seja, é a amostra negativa para a PCR e também negativa para o método de referência, dividida pelo número total de amostras negativas, vezes 100<sup>20</sup>.

Sensibilidade: É a habilidade do método de detectar variações leves do número de microrganismos de uma dada matriz. Pode também ser definida como a habilidade da PCR para detectar os microrganismos quando são detectados pelo método de referência; ou seja, é a amostra positiva para a PCR e também positiva para o método de referência, dividida pelo número total de amostras positivas, vezes 100<sup>20</sup>.

Desvio negativo: Ocorre quando um método alternativo fornece resultados negativos sem confirmação, e o método de referência fornece um resultado positivo. Este desvio torna-se um resultado falso-negativo quando um resultado verdadeiro pode ser provado como positivo.

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

## Protocolo de Validação (AOAC)

Segundo Feldsine *et al.*<sup>7</sup>, o protocolo de validação de procedimento de análise qualitativa consiste em uma série de experiências na qual são avaliados os seguintes parâmetros:

### Validação intralaboratorial

Categorias de alimentos: Analisar pelo menos 20 tipos diversos de alimentos selecionados das categorias de alimentos, segundo o anexo A do documento AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis<sup>7</sup>. Se não for possível validar o método para os 20 tipos, validar para pelo menos seis tipos de alimentos. Se não for possível adquirir um número suficiente de tipos de alimentos naturalmente contaminados para cada categoria, a contaminação artificial poderá ser utilizada.

Níveis de inóculo e controles: Cada tipo de alimento deve ser dividido em pelo menos duas porções. Uma porção será utilizada como controle negativo e a outra, inoculada a um nível que irá produzir a taxa de recuperação.

Número de amostras testadas: O número de porções testadas por inóculo é 20.

Amostras contaminadas naturalmente: Ao menos dois lotes de cada tipo de alimento contaminado naturalmente são requeridos.

Controles contaminados: Controles de amostras inoculadas e não inoculadas devem ser preparados no mesmo período para verificar se há contaminação cruzada. Se uma porção-controle não inoculada fornecer resultado positivo para o microrganismo inoculado, os resultados são invalidados e o procedimento deve ser repetido.

### Validação interlaboratorial

Número de laboratórios: São requeridos, no mínimo, dez laboratórios válidos por alimento. No entanto, devem ser incluídos de 12 a 15 laboratórios, em virtude de alguns serem eliminados por razões distintas.

Categorias de alimentos: O número de categorias depende da aplicabilidade do método. Por exemplo: o microrganismo em um alimento ou o microrganismo em todos os alimentos.

Culturas de inoculação: A escolha das culturas deve ser vasta o suficiente para representar a variação inerente aos microrganismos de interesse.

Níveis de inóculo e controles: Cada tipo de alimento deverá ser dividido em três porções, sendo uma inoculada, uma sem inoculação (branco) e uma com um alto nível de inoculação.

Número de amostras testadas: Seis porções por analito para cada tipo de alimento e seis porções-controle negativas para cada tipo de alimen-



to são requeridas. As porções devem ter códigos cegos quando forem enviadas aos laboratórios participantes da análise.

Uso de amostras contaminadas naturalmente e artificialmente: O uso de ambas as amostras é adequado.

Testes para diferença significativa e indicadores de desempenho: Examinar os dados para verificar se algum laboratório apresenta resultados aberrantes, que diferem das determinações de outros laboratórios<sup>24</sup>.

Segundo Feldsine *et al.*<sup>7</sup>, existem ainda indicadores de desempenho do método qualitativo, como:

*Razão de especificidade (p-) para um tipo de alimento e um nível de inoculação:* A probabilidade de o método classificar o teste da amostra como negativo, dado um teste que é realmente negativo. A razão da especificidade é definida como o número total de porções negativas analisadas pelo método, dividido pelo número total de porções negativas confirmadas por ambos os métodos, alternativo e de referência.

*Razão de sensibilidade (p+) para um tipo de alimento e um nível de inoculação:* A probabilidade de o método, alternativo ou de referência, classificar o teste da amostra como positivo, dado que o teste da amostra é realmente positivo. A razão da sensibilidade é definida como o número total de porções positivas pelo método, dividido pelo número total de porções positivas confirmadas por ambos os métodos, alternativo ou de referência.

*Razão de falso-negativo (pf-) para um tipo de alimento e um nível de inoculação:* A probabilidade de um teste, conhecidamente positivo, ser classificado como negativo pelo método. A razão de falsos-negativos é o número de testes positivos erroneamente classificados, dividido pelo número total de testes positivos. A incidência de falsos-negativos é igual a 100, menos a razão de sensibilidade.

*Razão de falso positivo (pf+) para um tipo de alimento e um nível de inoculação:* A probabilidade de um teste, conhecidamente negativo, ser classificado como positivo pelo método. A razão de falsos-positivos é o número de testes negativos erroneamente classificados, dividido pelo número total de testes negativos. A incidência de falsos-negativos é igual a 100, menos a razão de especificidade.

*Acordância:* É o percentual ou a chance de dois materiais de teste idênticos, analisados pelo mesmo laboratório sob as condições de repetitividade, fornecerem os mesmos resultados (os dois positivos ou os dois negativos)<sup>25</sup>.

*Concordância:* É o percentual ou a chance de dois materiais de teste idênticos analisados, enviados por laboratórios diferentes, fornecerem os mesmos resultados (os dois positivos ou os dois negativos)<sup>25</sup>.

## Tratamento estatístico dos dados

Existem vários testes estatísticos que podem ser utilizados em uma análise qualitativa. Abaixo, descrevemos os mais comuns.

### Testes para métodos qualitativos

Teste de McNemar (teste do Qui-quadrado -  $X^2$ ): A proporção de positivos confirmados para o método alternativo não deve diferir estatisticamente da proporção de positivos confirmadas pelo método de referência para cada tipo de alimento e cada nível de inoculação. O teste de McNemar (Qui-quadrado) é utilizado para comparar as proporções dos métodos. O Qui-quadrado definido por McNemar é:  $X^2 = (|a-b| - 1)^2 / a + b$

Onde:

*a* é igual aos testes dados como positivos confirmados pelo método alternativo, mas que são negativos pelos testados pelo método de referência.

*b* é igual aos testes dados como negativos pelo método alternativo, mas que são positivos confirmados pelo método de referência.

Valores do Qui-quadrado maiores ou iguais a 3,84 indicam que as proporções positivas confirmadas pelos métodos alternativos e de referência diferem significativamente para um nível de significância *p* menor ou igual a 0,05.

Determinação da acordância para o laboratório<sup>25</sup>: Acordância (estimada) =  $\{k(k-1) + (n-k)(n-k-1)\} / n(n-1)$

Onde:

*n* é o número de resultados.

*k* é o número destes resultados que são positivos.

A acordância de todos os laboratórios participantes do teste é a média das probabilidades de cada laboratório.

Determinação da concordância<sup>25</sup>: Concordância (estimada) =  $\{2r(r-nL) + nL(nL-1) - AnL(n-1)\} / \{(n^2) L(L-1)\}$

Onde:

*r* é o número total de positivos.

*L* é o número de laboratórios.

Né o número de repetições pelo laboratório. A é a acórdância, expressada como uma proporção.

Uma comparação entre acórdância e concordância pode ser utilizada para avaliar a magnitude da variação entre os laboratórios. Se a concordância é menor do que a acórdância entre laboratórios (isto é, as amostras analisadas no mesmo laboratório são mais prováveis de fornecerem o mesmo resultado do que aquelas enviadas por diferentes laboratórios), a variação está presente. Isto pode se dever, por exemplo, a variações na qualidade dos meios entre laboratórios, a diferenças na probabilidade de contaminação cruzada ou a diferentes interpretações dos guias pelos técnicos dos laboratórios.

A magnitude da concordância e da acórdância depende grandemente da sensibilidade, tornando difícil avaliar o grau de variação entre os laboratórios. Uma alternativa é calcular a *odds ratio* da concordância (COR):

$$COR = \frac{\text{acórdância} * (100 - \text{concordância})}{\text{concordância} * (100 - \text{acórdância})}$$

O ideal é que *odds ratio* seja bem próxima de 1,0, indicando que os resultados são imparciais e prováveis de serem os mesmos, sem restrição tanto para os mesmos laboratórios, quanto para laboratórios diferentes.

## Conclusão

Os métodos alternativos qualitativos podem ser utilizados como uma poderosa ferramenta na detecção de microrganismos patogênicos em alimentos. Porém, há necessidade de padronização de protocolos e de validação internacional. Após anos da introdução da PCR, a sua aplicação na detecção de patógenos alimentares deverá ser acelerada por intermédio da padronização. Este processo, que envolve várias fases de comparações experimentais e de elaboração de guias, é dinâmico, sendo um contínuo desenvolvimento. Com este trabalho, esperamos contribuir para este desenvolvimento.

## Colaboradores

VA Marin foi responsável pela concepção, delineamento metodológico e interpretação de dados. EI Freitas efetuou a interpretação dos dados, redação final e conclusão. AA Lemos foi responsável pela redação final.

## Referências

- World Health Organization. Food Safety and Food-borne Illness [serial on the Internet] [acessado em 2005 Mar 3]; [3 p.]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/index.html>
- Malorny B, Tassios PT, Radstrom P, Cook N, Wagner M, Hoorfar J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 2003; 83(1):39-48.
- Amaral FD. Como obter credibilidade nos resultados analíticos? *Rev Controle Contaminação* 2004; maio:30-3.
- Resolução da Diretoria Colegiada nº 210 de 04 de agosto de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos, conforme o Anexo I da presente Resolução. *Diário Oficial da União*, 2003. 14 ago. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>.
- Resolução – RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, 2003. 2 jun. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>.
- Food and Drug Administration (FDA). Guideline for submitting samples and analytical data for methods validation; 1987. US Government Printing Office. February, 1990-281-794:20818.
- Feldsine P, Abeyta C, Andrews WH. AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. *J AOAC Int* 2002; 85(5):1187-200.
- Lantz PG, Hägerdal BH, Radström P. Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. *Trends Food Sci Tech* 1994; 5(12):384-9.
- Hoorfar J, Cook N, Malorny B, Wagner M, De Medici D, Abdulmajjood A *et al.* Letter to the editor. *Lett Appl Microbiol* 2002; 38 (2):79-80.
- Hoorfar J, Cook N. Critical aspects of standardization. In: Sachse K, Frey J, editors. *PCR detection of microbial pathogens: Methods and protocols. Methods in molecular biology*. New Jersey: Humana Press; 2002. vol. 216 p. 51-64.
- Schoder D, Schmalwieser A, Schaubberger G, Kuhn M, Hoorfar J, Wagner M. Physical characteristics of six new thermocyclers. *Clin Chem* 2003; 49(6):960-3.
- Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses – selected sites, United States, 2000. *MMWR* 2001; 50(13):241-6.
- ISO 22174 – Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - General requirements and definitions, ISO, Geneva, Switzerland, 2005.
- Hoorfar J. EU seeking to validate and standardize PCR testing of food pathogens. *ASM News* 1999; 65(12):799.
- Aabo S, Rasmussen OF, Rossen L, Sorensen PD, Olsen JE. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1993; 7(3):171-8.
- Bäumler AJ, Heffron F, Reissbrodt R. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. *J Clin Microbiol* 1997; 35(5):1224-30.
- Cohen ND, Neiberghs HL, Wallis DE, Simpson RB, McGruder ED, Hargis BM. Genus-specific detection of salmonellae in equine feces by use of the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res* 1994; 55(8):1049-54.
- Kwang J, Littledike ET, Keen JE. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Lett Appl Microbiol* 1996; 22(1):46-51.
- Schulten SM, Benschop E, Nagelkerke NJD, Mooijman KA. Validation of microbiological methods. Enumeration of *Clostridium perfringens* according to ISO 7937. 2<sup>nd</sup> ed. Research for Man and Environment Report 286555002. February; 1997.
- Hoorfar J, Wolffs P, Radström P. Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. *APMIS* 2004; 112(11-12):808-14.
- Knutsson R, Blixt Y, Grage H, Borch E, Radström P. Evaluation of selective enrichment PCR procedures for *Yersinia enterocolitica*. *Int J Food Microbiol* 2002; 73(1):35-46.
- Saunders GC, Dukes J, Parkers HC, Cornett JH. Interlaboratory study on thermal cycler performance in controlled PCR and random amplified polymorphic DNA analyses. *Clin Chem* 2001; 47(1):47-55.
- Anklam E, Heinze P, Kay S, Van Den Eede G. Validation studies and proficiency testing. *J AOAC Int* 2002; 85(3):809-15.
- McClure FD. Design and analysis of qualitative collaborative studies: Minimum collaborative program. *J AOAC Int* 1990; 73(6):953-60.
- Langton SD, Chevennement R, Nagelkerke N, Lombard B. Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. *Int J Food Microbiol* 2002; 79(3):175-81.

---

Artigo apresentado em 25/04/2005

Aprovado em 17/12/2005

Versão final apresentada em 26/01/2006