

Avaliação ou validação de métodos microbiológicos?

Luis Henrique da Costa

BioControl

BIOCONTROL

Results. Right now.

Validar ou Avaliar?

www.aoac.org



AOAC INTERNATIONAL METHODS COMMITTEE GUIDELINES FOR VALIDATION OF QUALITATIVE AND QUANTITATIVE FOOD MICROBIOLOGICAL OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS

Feldsine, Philip, BioControl Systems, Inc., 12822 SE 32nd Street, Bellevue, WA. 98005 USA

Abeyta, Carlos, U.S. Food and Drug Administration, Seafood Products Research Center, 22201 23rd Drive S.E., Bothell, WA 98021-4421 USA



Andrews, Wallace H., U.S. Food and Drug Administration, Division of Microbiological Studies, 5100 Paint Branch Parkway, College Park, MD 20740-3835 USA

www.iso.org

ISO 16140:2003  

Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative methods

Edition:	1 (Monolingual)
Number of pages:	74
Technical committee / subcommittee:	TC 34/SC 9; ISO Standards
ICS:	07.100.30
Status:	✔ Published standard
Current stage:	60.60
Stage date:	2003-04-30
Revision information:	None

	Size	Price
 ISO 16140:2003 PDF version (en)	689 KB	CHF 176,00
 ISO 16140:2003 PDF version (fr)	5695 KB	CHF 176,00

Resumo comparativo entre formatos AOAC e Europeos (Método Quantitativo)

	AOAC-RI	AOAC-OMA	ISO 16140	AFNOR	NORDVAL
	SLV ⁽¹⁾	HCV	HCV	SLV ⁽¹⁾	SLV
Methods Comparison Study					
No. foods	20	20	15 ⁽²⁾	4	4
No. levels	4	4	5	5	4
No. replicates/level	5	5	2	2	5
No. data points	400	400	150	140	80
Pure cultures ⁽³⁾					
Target	30	30	30	20	30
Non-target	20	20	20	10	20
Inter-Laboratory Collaborative Study					
No. foods	Not performed	6	1	1	1
No. labs		8	8	8	8
No. levels		4 ⁽⁴⁾	4 ⁽⁴⁾	4	4
No. replicates/level		2	2	2	2
No. data points		384	>96	64	64

(1) Could become MLV if inter-laboratory study follows ISO 16140 and at least 2 laboratories were involved

(2) 5 food categories required for full matrix applicability with 3 specific food types per category

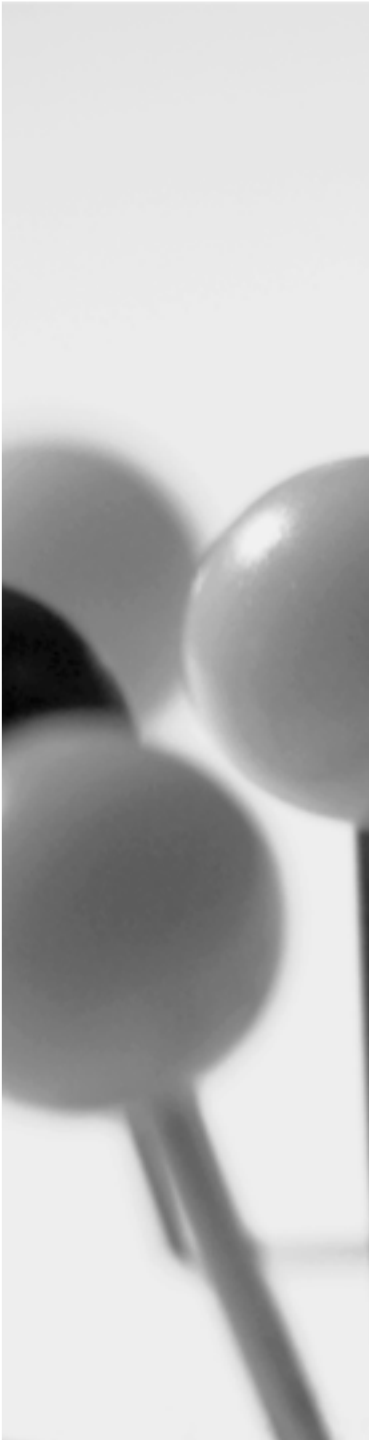
(3) Applicable to methods for specific organisms only

(4) 3 inoculated plus 1 negative control

Qual objetivo do protocolo de validação?

- Recuperar o(s) microrganismo(s) em diferentes tipos de alimentos.
- Simular diferentes condições das amostras. Temperatura, atividade de água, pH...
- Simular diferentes condições de concentrações do microrganismo frente a outros microrganismos presentes na mesma amostra.(Inclusividade e exclusividade)
- Garantir que o método gere resultados confiáveis mesmo sendo executado por pessoas diferentes.

Validações AOAC e ISO 16140 são feitas comparando com um método de referência e não com outro método alternativo.



Sim, um laboratório de controle de qualidade pode seguir os protocolos da ISO e AOAC e fazer uma validação de um novo método...

...mas o tempo e o custo disso são desnecessários caso o método já tenha passado por essas validações internacionais.

Portanto os pontos a seguir para escolha de método são:

- Confirmar que o método tenha aprovação AOAC ou seguiu a ISO 16140.
- Exigir que o fornecedor mantenha estoque compatível com o seu consumo previsto.
- Observar que preço do método seja compatível com o benefício que ele trará para o laboratório mesmo que a médio prazo.
- AVALIAR como o procedimento do método afetaria a rotina do laboratório.
- Avaliar que o percentual de falsos positivos e falsos negativos do método seja igual ou melhor que os gerados pelo procedimento usado atualmente.



Avaliando um método alternativo...

1. Inoculando as amostras de rotina com a bactéria de estudo.
2. Usando suas próprias amostras sem inocular
3. Colocar o método em rotina e observar os resultados comparando com os dados históricos do laboratório.

Inoculando amostras de rotina.

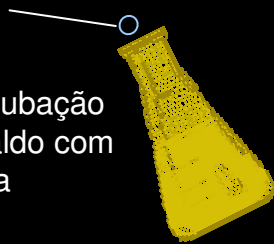
1- Preparar uma agenda com os passos da avaliação:

Testes avaliação do método X para Salmonella			
Programa baseado em 70 amostras para Salmonella em duplicata			
Segunda Ferie 14/06/2010			
Preparo das Culturas para inoculação das amostras no dia seguinte - nome do responsável			
preparar/ativar as cepas de Salmonella - inocular as cepas em caldo BHI para ativação e enriquec.			
Solicitar o envio das amostras para o laboratorio para dia seguinte.			
Prepara os meios de cultura a serem usados no dia seguinte.			
terça feira 15/06/2010			
Fazer check list verificando que os materiais estão todos no laboratório			
Confirmar recebimento das amostras exemplo:			
Nuggests de Frango			
Coxas de frango			
swabs de superficie			
Meio de Cultura preparados confere:			
BPW, 225 mL - 20 frascos ou bolsas Nasco contendo 225ml de Agua peptonada Tamponada			
Tubos de 10ml para swabs de superficie contendo BPW.			
11:00	Inocular as cepas de salmonella nas amostras correspondentes.		
	Pesar e preparar 10 amostras inoculadas e 10 não inoculadas para Samonella.		
	Incubar conforme indicado nas metodologias.		
	Solicitar amostras adicionais para o dia seguinte...		
Quarta Ferie 16/06/2010			
08:15	Preparar os agares seletivos para Salmonella - nome do responsavel		
	Preparar tubos de Caldo Rappaport Vassiliadis para GDS, 10 mL- nome responsavel		
09:00	Analise no Método X das amostras enriquecidas do dia anterior - nome responsavel		
	Preparar caldo BPW para 10 amostras Salmonella - nome do responsável		
10:00	Pesar e Enriquecer as novas amostras para Salmonella - nome do responsavel		
11:00	Transferir amostras do dia anterior para caldo RV - nome do responsavel		

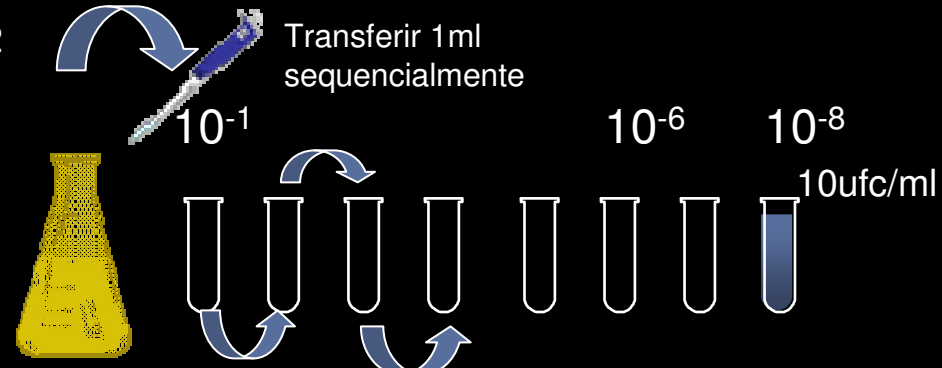
2-Preparo diluição serial para inoculação de 1 a 5ufc/ml de Salmonella

Passo 1 -Cultivar a cepa pura em Caldo BHI ou TSB por 18-24 horas a 35-37°C

Após essa incubação voce terá o caldo com 10^9 UFC/ml da bacteria.

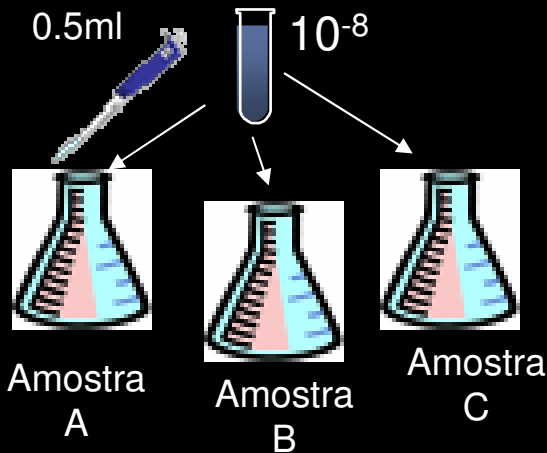


Passo 2



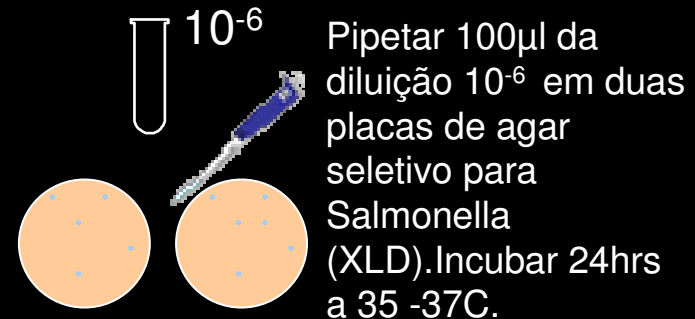
A partir do Caldo concentrado com 10^9 fazer diluição serial de 8 tubos até diluição 10^{-8}

Passo 3 - A concentração do último tubo é 10ufc/ml



Incubar esses caldos + amostras e seguir procedimento do método a ser testado.

Confirmação da contagem para confirmar quantas UFC/ml estamos inoculando nos caldos com amostras.



Contar as duas placas e fazer a média. Com essa média conseguirá calcular quantas ufc contém os 0.5ml inoculados nas amostras.

3- Avaliação estatística

- Um mínimo de 98% das amostras inoculadas devem gerar resultados positivos.
- Amostras não inoculadas que apresentem positividade devem ser confirmadas por provas bioquímicas.

Relatório Final

- Após avaliação é fundamental redigir o relatório contendo o procedimento realizado para as análises bem como os resultados finais e conclusão.
- Sempre que possível é importante inserir imagens de momentos da avaliação afim de indicar pontos críticos do método que ajudarão em muito na preparação dos POP para a nova análise ser colocada em rotina no laboratório.



OBRIGADO

Luis Henrique da Costa

luis@biocontrolsys.com