



# GUÍA

## PARA LA EVALUACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

**GUÍA**  
PARA LA EVALUACIÓN  
DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS







A close-up photograph of several petri dishes containing bacterial cultures. The media is a yellowish agar. In the foreground, a petri dish has a single, dark, circular antibiotic disc placed on the surface. Other dishes in the background show varying degrees of bacterial growth and disc placement. The image is framed by decorative borders on the left and right sides, featuring a complex, maze-like pattern in shades of blue, green, and orange.

# SERIE 1: ALIMENTOS

# GUÍA

## PARA LA EVALUACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

### SERIE 1. ALIMENTOS

#### **INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGÍA - INM**

María del Rosario González Márquez  
Director General

Edna Julieth Villarraga Farfán

Subdirección de Metrología Química y Biología

#### **INSTITUTO DE SALUD PUBLICA DE CHILE . ISP**

Rubén Verdugo Castillo

Director

Ingeniero Marcelo Soto Varas

Sección Metrología Científica en Química y Biomediciones  
Departamento Nacional y de Referencia en Salud Ambiental

#### **GQSP COLOMBIA - PROGRAMA DE CALIDAD PARA LA CADENA DE QUIMICOS**

Juan Pablo Díaz-Castillo

Gerente de Proyecto y Oficial de Desarrollo Industrial de la  
ONUDI

Helen Jhoana Mier Giraldo

Asesora Técnica Regional.

Javier Francisco Fernández Rodríguez  
Coordinador Técnico Nacional

#### **AUTORES**

María del Rocío Morato Rodríguez - INM

Profesional especializado - Instituto Nacional de Metrología  
de Colombia - INM

John Emerson Leguizamón Guerrero - INM

Profesional especializado - Instituto Nacional de Metrología  
de Colombia - INM

Fabiola Rojas Cornejo

Profesional encargada del Laboratorio  
Biometrología - Instituto de Salud Pública de Chile- ISP Chile

#### **REVISIÓN**

Luz Jenny Urrego Laiton

Consultora en Sistemas de Gestión - GQSP Colombia

#### **DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN:**

Autorun D+C

Dirección de arte y diseño

Arturo Velasco F.

ISBN 978-628-95752-1-7

Para más información, contacte a:

**Instituto Nacional de Metrología**

Av. Cra. 50 No. 26 – 55 Int. 2 CAN

Bogotá D.C – Colombia

Tel: +57 1 254 22 22

[www.inm.gov.co](http://www.inm.gov.co)

Año 2023



# AGRADECIMIENTOS



Esta guía es el resultado del trabajo conjunto entre el Instituto Nacional de Metrología de Colombia - INM y el Instituto de Salud Pública de Chile con el apoyo de los miembros de la Red Colombiana de Metrología – RCM y de El GQSP Colombia es ejecutado por la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUUDI), y es financiado por la Secretaría de Estado para Asuntos Económicos de la Confederación Suiza (SECO) y el Ministerio de Comercio, Industria y Turismo (MinComercio), a través de Colombia Productiva.

La elaboración de este documento, fue posible gracias al apoyo de Fabiola Rojas Cornejo, encargada del Laboratorio de Biometrología de la Sección Metrología Científica en Química y Biomediciones, perteneciente al Departamento Nacional y de Referencia en Salud Ambiental, Instituto de Salud Pública de Chile, de Luz Jenny Urrego Laiton, Consultora de Sistemas de Gestión del Programa de Calidad para la Cadena de Químicos GQSP Colombia que es ejecutado por la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial ONUUDI y el grupo de Metrología en Bioanálisis del INM.

# TABLA DE CONTENIDO



Introducción	1
Objetivo y Alcance	6
Abreviaturas	7
Definiciones	8
CAPITULO 1. La medida en microbiología	12
1.1 Los métodos de análisis en microbiología	13
1.2 Tipos de métodos microbiológicos	16
1.2.1. Los métodos microbiológicos basados en cultivo	18
1.2.1.1. Clasificación de los medios de cultivo	20
1.2.1.2 Métodos de recuento o enumeración	21
1.2.1.3 Métodos de cultivo para detección	24
1.2.2 Métodos de identificación o de confirmación	27
1.3 El material de referencia en microbiología	29
1.4 Consideraciones particulares de la medida en microbiología	38
CAPITULO 2. Adecuación de uso de los métodos microbiológicos	43
2.1 ¿Validar o verificar?	46
2.1.1 Validación	46
2.1.2 Verificación	47
2.2 Requisitos previos para la evaluación del desempeño de los métodos de ensayo microbiológicos	50
2.2.1 Selección del método	54
2.3 Preparación del inóculo	55
2.4 Selección de las muestras	60
2.5 Evaluación de medios de cultivo	63
CAPITULO 3. Validación	64
3.1 Parámetros o características de desempeño para validación	76
3.1.1 Protocolo para validación de un método en un solo laboratorio	80



3.1.1.1	Estudio de validación en un solo laboratorio	82
3.1.1.2	Con aproximación factorial	84
3.1.1.3	Con aproximación convencional	89
CAPITULO 4. Verificación _____		95
4.1	Parámetros o características de desempeño para verificación	105
4.1.1	Cualitativos	105
4.1.1.1	LOD <sub>50</sub> estimado (eLOD <sub>50</sub> )	105
4.1.2	Cuantitativos	112
4.1.2.1	Desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio	112
4.1.2.2	Sesgo estimado (eBias)	116
Comentarios _____		122
Referencias bibliográficas _____		125
Anexos _____		132

# INTRODUCCIÓN



El diagnóstico microbiológico tiene una repercusión decisiva en el ámbito de aplicación de la industria, la salud pública o del medio ambiente. La ejecución de los ensayos debe asegurar la confiabilidad de sus resultados, a través del cumplimiento de una serie de requisitos técnicos y garantías, que permitan entregar resultados trazables y comparables; avalados por un sistema de gestión de calidad.

A partir de la publicación del estándar ISO/IEC 17025, la validación y la verificación de los métodos microbiológicos cobra un papel fundamental, en tanto que el trabajo de los laboratorios se centra en demostrar, de manera objetiva, frente a los organismos que otorgan reconocimiento y acreditación, que el método o el sistema de medición seleccionado cumple los parámetros de desempeño establecidos y que el laboratorio es competente para ejecutarlo.

La importancia de la evaluación del desempeño de métodos de ensayo microbiológicos se ve reflejada en la normalización de esta actividad. Internamente, la Organización Internacional de Estandarización (ISO) en los Comités Técnicos (CT) elabora documentos para orientar la validación/verificación; por ejemplo, el Comité Técnico ISO/CT 34 de Productos Alimenticios, publica los estándares de la familia de las ISO 16140, el Comité ISO/CT 147 de Calidad del Agua publica el estándar ISO 13843 y el Comité ISO/CT 212 de Ensayos en Laboratorio clínico y tests con sistemas de Diagnóstico in-vitro es responsable del estándar ISO 15195. Así mismo, hay publicaciones científicas de otras organizaciones que pueden ser consultadas como las de AOAC, FDA, EPA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, las farmacopeas y documentos de Eurachem; así como también documentación de organismos de certificación tales como AFNOR, NMKL y Microval.



Esta guía intenta recoger la información de normas y protocolos internacionales haciendo más fácil el acceso y entendimiento en lo que se debe hacer, para evaluar el desempeño de los métodos microbiológicos en alimentos. La guía está dirigida a los laboratorios de ensayos microbiológicos que estén interesados en evaluar los parámetros de desempeño que pueden ser medidos o comprobados y otorgan datos sobre el desempeño del método en unas determinadas condiciones de ejecución y para un uso previsto.

El documento está organizado en capítulos, los cuales incluyen las consideraciones generales de la medida en microbiología y los lineamientos para la validación y la verificación de métodos microbiológicos.

Los lectores deben saber, que no hay un acuerdo universal sobre las definiciones de los términos usados en la validación de métodos, por esta razón la guía no hace énfasis en las definiciones, sin embargo, como referencia se usan las del VIM, las de las guías AOAC y las de la ISO.



---

# OBJETIVO



Disponer de un documento que identifique las actividades y consideraciones necesarias para llevar a cabo la evaluación de desempeño de los métodos microbiológicos de cultivo, en matrices de alimentos de consumo humano y animal siguiendo los lineamientos internacionales, además de facilitar la comprensión y el cumplimiento de requisitos para la competencia de los laboratorios de microbiología.



---

# ALCANCE



La guía está dirigida a los laboratorios de ensayo microbiológicos en alimentos de consumo humano y animal, que detecten y/o cuantifiquen microorganismos de interés y que estén interesados en evaluar los parámetros de desempeño del método para un uso previsto, bajo condiciones establecidas para que entreguen datos confiables y comparables.





# ABREVIATURAS



## **ISO**

Organización Internacional de Normalización

## **AOAC**

Asociación de Colaboración Analítica Oficial Internacional

## **ICMSF**

Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos

## **VIM**

Vocabulario Internacional de Metrología

## **UFC**

Unidades Formadoras de Colonia  
Unidades Formadoras de Placas

## **NMP**

Número más probable

## **CEN**

Comité Europeo de Estandarización

## **USP**

Farmacopea de los Estados Unidos

## **MR**

Material de Referencia

## **MRC**

Material de Referencia Certificado

## **PCR**

Reacción en Cadena de la Polimerasa

## **WFCC**

Federación Mundial de Colecciones de Cultivos

## **ECCO**

Organización Europea de Colecciones de Cultivos

## **GTC**

Guía Técnica Colombiana

## **NMKL**

Comité Nordico de Análisis de Alimentos

## **AFNOR**

Asociación Francesa de Normalización

## **NEN**

Instituto de Normalización de los Países Bajos

## **DIN**

Instituto Alemán para la Normalización

## **IDF**

Federación Internacional de Lechería

## **FDA**

Administración de Medicamentos y Alimentos

## **BAM**

Manual Analítico Bacteriológico

## **USDA**

Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

## **OIE**

Organización Internacional de Sanidad Animal

## **MicroVal**

Organismo internacional de certificación para la validación y aprobación de métodos

## **FSIS**

Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria

# DEFINICIONES



**Analito:** microorganismos o productos (e.j DNA, proteínas, toxinas) medidos o detectados por un método de análisis<sup>1</sup>.

**Alcance de la validación:** analitos, concentraciones y matrices para los cuales un método de análisis validado puede ser usado satisfactoriamente<sup>2</sup>.

**Cepa objetivo (target):** cepa, definida de acuerdo con el alcance del método de referencia, que se espera que pueda ser detectada por el método alternativo<sup>2</sup>.

**Ensayo de aptitud:** es una evaluación del desempeño de los participantes con respecto a criterios previamente establecidos mediante comparaciones interlaboratorios<sup>3</sup>.

**Estudio interlaboratorio:** estudio adelantado por varios laboratorios de ensayo con muestras idénticas en el mismo momento, los resultados pueden ser usados para estimar parámetros de desempeño de un método alternativo<sup>2</sup>. El objetivo del estudio interlaboratorio es determinar la variabilidad de los resultados obtenidos por diferentes laboratorios en la misma muestra<sup>2</sup>.

**Estudio colaborativo:** un estudio de validación realizado por múltiples laboratorios para estimar los parámetros críticos de rendimiento del método candidato<sup>4</sup>.

**Falsos positivos (Desviación positiva):** cuando el resultado confirmado del método alternativo es positivo y el resultado del método de referencia es negativo<sup>2</sup>.

**Falsos negativos (Desviación negativa):** resultado negativo del método alternativo cuando el resultado del método de referencia correspondiente es positivo<sup>2</sup>.

**Límite de cuantificación:** mínima concentración de analito que puede ser cuantificada con un nivel aceptable de precisión y veracidad bajo las condiciones del método. Solo aplica para los métodos cuantitativos<sup>2</sup>.

**Límite de detección (LOD):** concentración de analito obtenida mediante un procedimiento de medición definido, con una probabilidad de detección determinada, ejemplo: LOD<sub>50</sub> o LOD 95.

## DEFINICIONES



En microbiología la determinación se basa en replicados de análisis con tres niveles de inoculación del analito objetivo. Aplica para métodos cualitativos en microbiología. Para ampliar la información, consultar ISO 16140-1. Vocabulario<sup>2</sup>.

**Límite de detección 50 (LOD<sub>50</sub>):** concentración de analito en la cual, la probabilidad de detección es del 50%<sup>1</sup>.

**Mensurando:** magnitud que se desea medir.

**Nota:** La especificación de un mensurando requiere el conocimiento de la naturaleza de la magnitud y la descripción del estado del fenómeno, cuerpo o sustancia cuya magnitud es una propiedad, incluyendo las componentes pertinentes y las entidades químicas involucradas<sup>5</sup>.

**Método de referencia:** método internacionalmente aceptado y ampliamente reconocido<sup>2</sup>.

**Método normalizado:** métodos normalizados, son aquellos publicados en normas internacionales, nacionales, regionales o por organizaciones técnicas reconocidas o en revistas científicas per-

tinentes y aceptadas por el sector técnico en cuestión<sup>6</sup>.

aquellos publicados como normas oficiales o publicados por organismos de normalización nacionales o internacionales. Ejemplo FDA, USDA, ISO, AOAC<sup>7</sup>.

**Método no normalizado:** métodos propios o desarrollados por el laboratorio, obtenidos de publicaciones científicas, así como métodos normalizados que han sido ampliados, modificados o usados fuera del alcance propuesto<sup>7</sup>.

**Método alternativo:** método de análisis que detecta o cuantifica, en una determinada categoría de productos, el mismo analito que puede ser detectado o cuantificado por el método de referencia. Métodos sometidos a validación<sup>2</sup>.

**Método de identificación:** método utilizado para confirmar la identidad de un analito, por ejemplo, serotipificación<sup>8</sup>.

**Precisión:** grado de acuerdo entre resultados independientes bajo determinadas condiciones<sup>1</sup>.

## DEFINICIONES



**Repetibilidad:** precisión en condiciones de repetibilidad <sup>9</sup>.

**Condiciones de repetibilidad:** condiciones en las que se obtienen resultados de ensayos independientes, con el mismo método en elementos de ensayo idénticos, en el mismo laboratorio por el mismo operario y con el mismo equipo en intervalos cortos de tiempo <sup>9</sup>.

**Reproducibilidad:** precisión en condiciones de reproducibilidad <sup>9</sup>.

**Condiciones de reproducibilidad:** condiciones en las que se obtienen resultados de ensayos independientes, con el mismo método en elementos de ensayo idénticos en diferentes laboratorios, con diferentes operarios y utilizando diferentes equipos <sup>9</sup>.

**Veracidad relativa:** grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método alternativo frente al método de referencia, usando muestras idénticas <sup>2</sup>.

**Sensibilidad:** capacidad del método de referencia o del alternativo para detectar el analito correctamente en la presunta inspección <sup>2</sup>.

**Selectividad:** el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar <sup>10</sup>. Se puede expresar como la relación entre el número de colonias objetivo y el número total de colonias en una muestra <sup>11</sup>. También se conoce como especificidad analítica.

**Trazabilidad:** la trazabilidad se refiere a la integridad de la información sobre cada paso en una cadena de proceso. Es la capacidad de verificar el historial, la ubicación o la aplicación de un artículo mediante una identificación documentada y registrada <sup>12</sup>. La trazabilidad en microbiología es la trazabilidad documental o rastreabilidad del origen del microorganismo a una fuente o un origen relevante, que debe garantizar la colección

## DEFINICIONES



biológica en la cual está depositado el espécimen.

**Trazabilidad metrológica:** propiedad de un resultado de medida, por el cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida<sup>5</sup>. ILAC considera que los elementos necesarios para confirmar la trazabilidad metrológica son: una cadena de trazabilidad metrológica ininterrumpida a un patrón internacional, un patrón nacional, una incertidumbre de medida documentada, un procedimiento de medida documentado, una competencia técnica reconocida, al SI (sistema internacional de unidades) y a los intervalos entre calibraciones<sup>5</sup>.

**Unidades formadoras de colonia (UFC):** las UFC son el número mínimo de células separables sobre la superficie o

dentro de un medio de agar semisólido, que da lugar al desarrollo de una colonia visible del orden de decenas de millones de células descendientes<sup>13</sup>. La UFC es una unidad de medida que no forma parte del sistema internacional de medida SI.







# Capítulo 1



## LA MEDIDA EN MICROBIOLOGÍA


## 1.1 LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS EN MICROBIOLOGÍA

### »»

Los métodos de ensayo microbiológicos son importantes en diferentes ámbitos gubernamentales. A nivel nacional para hacer inspección, vigilancia y control, en el comercio internacional para determinar la conformidad con los requisitos microbiológicos, en el comercio nacional para asegurar el cumplimiento de los requisitos acordados, en la industria para garantizar la calidad y el control de los procesos, en la academia para adelantar procesos de investigación y en los laboratorios de referencia para generar datos de vigilancia epidemiológica <sup>14</sup>.

Los laboratorios que ejecutan métodos microbiológicos, se espera que estén adecuadamente equipados para que cumplan los requisitos de bioseguridad y que cuenten con personal competente, así mismo, es muy deseable que tengan sus métodos acreditados bajo el estándar ISO/IEC 17025 que les permite demostrar la competencia técnica para ejecutar los ensayos y contar con el reconocimiento de resultados válidos en el mundo globalizado <sup>15</sup>. En Colombia, el Organismo Nacional de Acreditación ONAC, cuenta con acuerdos de reconocimiento internacionales con el propósito de facilitar las transacciones comerciales entre los países firmantes; tanto para las acreditaciones como para las evaluaciones de conformidad. El reconocimiento internacional le permite al Subsistema Nacional de la Calidad de Colombia - SICAL, ser comparable con cualquier otra infraestructura de la calidad en el mundo para la aceptación de los resultados de evaluación de conformidad acreditados. El ONAC cuenta con reconocimientos otorgados por la Cooperación InterAmericana de Acreditación (IAAC por sus siglas en inglés) (cooperación regional), Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC por sus siglas en inglés) y Foro Internacional de Acreditación (IAF por sus siglas en inglés) <sup>16</sup>.

Es muy importante que los métodos empleados sean confiables y, por lo tanto, es necesario antes de realizar el análisis, determinar o evaluar las características de desempeño de los métodos usados, para asegurar que se están utilizando métodos debidamente validados y verificados. También, es importante que las partes interesadas estén



de acuerdo con el método empleado para facilitar la cooperación entre laboratorios con el reconocimiento mutuo de los métodos utilizados y, consecuentemente, facilitar el comercio internacional de bienes <sup>14</sup>.

Por otra parte, el continuo desarrollo y actualización de las técnicas y equipos cada vez más complejos han despertado el interés de los profesionales en microbiología en la validación o verificación de los métodos microbiológicos, con el fin de garantizar la validez y la calidad de los resultados de medición <sup>17</sup>.

Los métodos normalizados en microbiología han sido desarrollados por organizaciones internacionales como ISO (International Organization for Standardization), AOAC (Association of Official Analytical Collaboration International), CEN (Comité Européen de Normalisation), NMKL (Nordisk Metodikkomitté för Livsmeddel), AFNOR (Association Française de Normalisation), NNI (Nederlands Normalisatie Instituut), DIN (Deutsches Institut für Normung), IDF (International Dairy Federation), ICMSF (The International Commission on Microbiological Specifications for Foods) <sup>14</sup>, también algunas entidades regulatorias han publicado sus propios métodos oficiales como FDA BAM (US Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual), USDA (US Department of Agriculture Food Safety Inspection Service, Microbiology Laboratory Guidebook) <sup>18</sup>. La intención principal de estos métodos, es proveer a los usuarios con metodologías analíticas internacionalmente aceptadas, que permitan obtener resultados equivalentes y comparables en diferentes instalaciones (laboratorios). En esencia, estos métodos sirven solo como directrices analíticas, sin embargo, han sido históricamente recomendados por los gobiernos y agencias de comercio y están reconocidos como métodos oficiales para detección/enumeración de organismos en alimentos, por lo tanto, son considerados como los métodos de referencia <sup>14</sup>.



Los métodos normalizados pueden ser definidos como aquellos con una metodología reconocida que ha sido estudiada de una manera colaborativa y que han sido validados antes de ser aceptados <sup>18</sup>. No obstante, no todos los métodos normalizados de ISO en alimentos han sido validados, pero a pesar de la falta de estudios de validación extensivos, los métodos de ISO han sido internacionalmente aceptados como métodos de referencia. Hace algunos años, la organización ha sometido a validación algunos de sus métodos y los detalles han sido publicados en anexos <sup>14</sup>. Reconociendo esta dificultad, el estándar de ISO 16140-3 de 2021 presenta un anexo para abordar estos casos, el cual también puede ser útil para la verificación de aquellos métodos AOAC, FDA, USDA, IDF, etc, de los cuales no se encuentran publicados los datos de la validación.

**Nota:** Métodos normalizados. Ver Definiciones.

También están los métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificados, los métodos no normalizados y los métodos desarrollados por el laboratorio, en estos casos, la ISO/IEC 17025 requiere que estos métodos se validen para demostrar que se puede satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de aplicación y que sean pertinentes para las necesidades del cliente y coherentes con los requisitos especificados <sup>19</sup>.



## 1.2 TIPOS DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS:



Los métodos de ensayo microbiológicos pueden incluir metodologías convencionales, rápidas o alternativas y pueden estar basados en técnicas de cultivo (colonias, turbidez, cambio de color o fluorescencia), de microscopía, moleculares <sup>15</sup>, inmunoenzimáticas, por citometría o por técnicas de identificación. De manera general, los métodos de ensayo pueden dividirse en:

**1- Métodos cualitativos:** métodos de análisis cuya respuesta va a depender de la concentración (mínima) del analito y cuyo resultado final es la presencia o ausencia del analito, el cual es detectado directa o indirectamente en una determinada cantidad de muestra (por encima de un valor umbral definido por el propio método), generalmente 25 g o mL <sup>20</sup>. Para facilitar la recuperación de los microorganismos estresados, la porción de muestra se pre-enriquece en un caldo de enriquecimiento no selectivo, luego pasa a una etapa de enriquecimiento selectivo para seleccionar el microorganismos objetivo, posteriormente pasa a una etapa de subcultivo para aislamiento en medio selectivo-diferencial y por último confirmación de colonias presuntivas <sup>21</sup>. Esta detección puede darse por turbidez, cambios de color, fluorescencia o presencia de gas.

**2- Métodos cuantitativos:** método de análisis cuyo resultado es conocer la cantidad de analito medida, directa o indirectamente, en una determinada cantidad de muestra <sup>20</sup>. En esta categoría se encuentran:

**a. Método de Número más Probable (NMP):** es un método semi-cuantitativo, donde hay una estimación estadística basada en la teoría de probabilidades, para definir el número más probable de microorganismos en una muestra por unidad de masa o volumen <sup>22</sup>. Esta enumeración se realiza usando un medio líquido y se utiliza cuando se estima una baja enumeración del microorganismo objetivo (<100 UFC/g o mL) y una abundante flora microbiana acompañante <sup>23</sup>.

**b. Métodos de enumeración o de recuento:** se hace un conteo real del número de unidades formadoras de colonia (UFC) existentes en la porción de muestra analizada. En esta categoría se pueden encontrar: el recuento en placa con agar (superficie y profundidad), filtración por membrana, recuento en placa en espiral, recuento sobre láminas hidratables y



recuento sobre pads absorbentes. En general, la enumeración en medios sólidos se basa en la capacidad de muchos microorganismos para producir colonias, en o sobre medios de agar, que pueden reconocerse como tales a simple vista o con la ayuda de una lupa <sup>21</sup>.

**c. Observación microscópica:** determinar por observación directa el número de células. Los microscopios utilizan cámaras de recuento con profundidad y área conocidas junto con la ayuda de rejillas calibradas, por lo tanto, se puede calcular la concentración de las células por unidad de volumen <sup>24</sup>. El reporte es el número de células por mm<sup>3</sup>.

**Nota:** los recuentos en placa están asociados al concepto de membrana intacta, por lo tanto, son células bacterianas que son metabólicamente activas y que se dividen y crecen activamente en el medio de cultivo, en otras palabras, son células viables y cultivables.

Hay otros métodos microbiológicos en los cuales los analitos pueden ser metabolitos, material genético o antígenos <sup>25</sup>. Por ejemplo, los que utilizan hibridación fluorescente *in situ* (FISH por sus siglas en inglés) o la reacción en cadena de la polimerasa PCR, los cuales requieren consideraciones especiales, dependiendo de la forma en cómo se hace la determinación del número de microorganismos presentes; bien sea con una curva estándar para qPCR o ELISA o el recuento microscópico directo en FISH <sup>11</sup>. También hay técnicas analíticas más recientes, como la citometría de flujo, que es un sistema automatizado, multi-paramétrico y cuantitativo, que analiza las señales de luz disper-

sas y fluorescentes producidas por una célula al pasar por un haz de luz y que permite diferenciar poblaciones celulares simultáneamente, además de identificar y cuantificar células.

Algunos métodos no incluyen una etapa de confirmación por lo cual requieren de una confirmación externa usando, por ejemplo, kits de identificación bioquímica, serotipificación, test de composición química (ejemplo, MALDI-TOF) o pruebas moleculares. En cualquier caso, ésta etapa debe ser considerada dentro de la verificación/validación del método ya que por un lado influencia el resultado de medida, y por el otro define el microorganismo objetivo <sup>11</sup>.

## 1.2.1 LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS BASADOS EN CULTIVO



La mayoría del trabajo en microbiología se basa en los métodos de cultivo de microorganismos que permiten verificar la viabilidad de los mismos usando medios de cultivo para recuento o para detección de el/los microorganismos objetivo <sup>26</sup>. El cultivo ha existido por más tiempo que otros métodos de análisis microbiológicos y por eso se convirtió en el método de referencia para algunos analitos <sup>27</sup>, y por lo tanto, los métodos de cultivo son los métodos convencionales que más se utilizan.

De igual forma, se reconoce que los métodos convencionales basados en crecimiento tienen limitaciones, como la reconocida imposibilidad de los métodos de cultivo para determinar el valor verdadero de microorganismos viables en una muestra <sup>26</sup>, ha sido más evidente con el avance tecnológico y el mayor entendimiento científico <sup>28</sup>. Por ejemplo, los métodos basados en otras técnicas diferentes a las de cultivo (marcadores celulares basados en crecimiento, en viabilidad, en ácidos nucleicos o en ácidos grasos), son más adecuadas; porque pueden entregar información más sensible, precisa, exacta, reproducible, para detección de células viables no cultivables (VBNC por sus siglas en inglés) <sup>28</sup>.

Es importante mencionar que el estado VBNC de las células representa un problema para los análisis de rutina en el laboratorio, la razón es que la viabilidad está asociada al metabolismo y a la membrana intacta, por lo tanto, si no se detectan UFC es porque están muertas o podría tratarse de VBNC donde su metabolismo no ha permitido la proliferación <sup>29</sup>.



Los análisis podrían incluir: la medición de la actividad metabólica, la activación de la membrana, el contenido de ARN y/o ADN, la permeabilidad de la membrana, etc., llegando a determinar la máxima viabilidad, degradación potencial y muerte <sup>29</sup>.

Para comprender esta forma de estado celular VBNC, se puede resumir como lo contrario a una célula muerta; estas últimas tienen una membrana dañada que no pueden retener el ADN cromosómico y plasmídico y son metabólicamente inactivas, mientras que las células VBNC tienen una membrana intacta que contiene información genética intacta, se encuentran metabólicamente activas y realizan respiración. Por otro lado, al comparar las VBNC con las células viables, las células VBNC tienen muchas diferencias fisiológicas y moleculares con respecto a las células cultivables viables, estas diferencias incluyen: la morfología celular, la composición de la pared y la membrana celular, el metabolismo, la expresión génica, las resistencias físicas y químicas, las propiedades de adhesión y el potencial de virulencia. En términos de morfología celular, una reducción en el tamaño de la célula es probablemente una estrategia para minimizar los requisitos de energía. El estado de VBNC puede revertirse mediante reanimación como la reversión del

metabolismo y cambios fisiológicos que caracterizan a las células VBNC <sup>30</sup>.

Así las cosas, los métodos basados en cultivo para análisis microbiológicos implican múltiples pasos, que incluyen:

- **La preparación/adquisición de los medios de cultivo o detectores.**
- **Preparación del inóculo.**
- **La inoculación.**
- **Posiblemente la dilución en serie.**
- **La incubación.**
- **Aislamiento.**
- **Identificación y el recuento de colonias**

### ***Cuando el propósito es la cuantificación.***

El aspecto fundamental, que hace que esta metodología funcione, es la multiplicación de esos microorganismos objetivo que han sido inoculados en medios de cultivo apropiados e incubados en condiciones y tiempos adecuados <sup>27</sup>.

## 1.2.1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO



Los medios de cultivo se pueden clasificar principalmente por su consistencia física: sólidos, semisólidos, líquidos y, tienen presentaciones tales como medios preparados a partir de formulaciones deshidratadas disponibles comercialmente, medios listos para su uso y medios preparados a partir de componentes individuales básicos <sup>31</sup>.

También se pueden clasificar dependiendo de la función que desempeñan<sup>15,31</sup>.

- **Enriquecimiento:** cuya función es permitir el crecimiento de las células dañadas o injuriadas.
- **Selectivos:** que contienen en la fórmula agentes selectivos que inhiben el crecimiento de microorganismos acompañantes y permiten el crecimiento de un tipo de microorganismo determinado.
- **Diferenciales:** que permiten exhibir a los microorganismos reacciones diferentes frente a la utilización de un sustrato en particular.
- **Transporte:** para preservar y mantener la viabilidad de los microorganismos minimizando cambios debido al tiempo entre la recolección de la muestra y el procesamiento.
- **Diluyente:** para separar los microorganismos de un producto de prueba sólido en una fase líquida y/o para reducir su concentración por dilución.
- **Aislamiento:** permite el crecimiento de microorganismos objetivo específicos, mientras inhibe total o parcialmente, otros microorganismos.
- **Identificación:** produce una reacción de identificación específica que generalmente no requiere ninguna prueba confirmatoria adicional.
- **Confirmación:** contribuye a la identificación o caracterización de un microorganismo después de una etapa preliminar (enriquecimiento, aislamiento).
- **Neutralizador:** contienen ingredientes neutralizantes para inactivar detergentes, desinfectantes u otros agentes biocidas.
- **Referencia:** es un medio no selectivo, para la evaluación comparativa del desempeño independiente de medio de cultivo bajo prueba y es usado como un control.

La clasificación de acuerdo con su composición puede ser:

- **Medios químicamente definidos**
- **Medio químicamente indefinido o parcialmente indefinido**
- **Medio de cultivo cromogénico**
- **Medio de cultivo fluorogénico**

Los métodos de ensayo convencionales, basados en cultivos para aislar, cultivar o enumerar el microorganismo objetivo, se reconocen como los métodos analíticos de referencia para el control oficial por parte de las autoridades reguladoras y se consideran el “método de referencia” en el diagnóstico de alimentos o aguas para el comercio internacional y para las pruebas de conformidad <sup>27</sup>.

### 1.2.1.2 MÉTODOS DE CULTIVO PARA RECuento O ENUMERACIÓN



Si el objetivo del análisis es determinar la concentración de microorganismos en la muestra, entonces los métodos de cultivo pueden ser usados para enumerarlos, es decir para estimar el número de microorganismos viables en la muestra analizada. Los conteos de viables se pueden asociar con calidad, la vida útil o condiciones de inocuidad del producto muestreado <sup>15</sup>. En otros casos, cuando son alimentos fermentados con altas concentraciones de microorganismos propios de la muestra (como es el caso de los cultivos probióticos), puede ser necesario contar con mucha precisión la cantidad de células viables benéficas, ya que de esta manera es que son evaluados estos productos <sup>15</sup>.

La técnica estándar para recuento de microorganismos es el recuento en placa, que puede ser realizada en profundidad o superficie y que permite contar microorganismos aerobios y aerobios facultativos. Hay otras técnicas en medios líquidos, como el Número Más Probable (NMP) <sup>27</sup> y el recuento directo de células usando microscopía o con citometría de flujo.



Los recuentos de colonias viables se basan comúnmente en el número de colonias que se desarrollan en una placa de agar (medio sólido) que han sido previamente inoculadas con cantidades conocidas de suspensiones diluidas de la muestra e incubadas en condiciones ambientales determinadas <sup>32</sup>.

Las etapas de dilución son un requerimiento básico para la enumeración de microorganismos, de manera que se puedan alcanzar poblaciones contables en las cajas de Petri, idealmente entre 25 y 50 UFC. Para alcanzar esta concentración se hacen diluciones seriadas (sucesivas), generalmente 1:10. Se hacen tantas diluciones como sean necesarias para poder contar las UFC en cajas de Petri <sup>15</sup>.

De otro lado, el método del número más probable (NMP), es un ensayo estadístico de múltiples pasos que consta de fases presuntivas, confirmativas y complementarias. Por lo tanto, a diferencia del recuento de aerobios en placa, el NMP no proporciona una medida directa del recuento bacteriano. El NMP es particularmente útil para concentraciones bajas de organismos (<100/g o mL), especialmente en leche y agua, y para aquellos alimentos cuyas partículas pueden interferir con el recuento exacto de colonias <sup>23</sup>. En el ensayo, se inoculan diluciones seriadas de una muestra en medio líquido, se cuentan los tubos positivos (cambio de color, gas, fluorescencia) a partir de los



cuales se realizan las otras fases del ensayo según el método, y luego utilizan las combinaciones de resultados positivos para consultar una tabla estadística y así estimar el número de organismos <sup>33</sup>.

En ocasiones, los ecosistemas microbianos en las muestras analizadas, así como los tratamientos aplicados a los productos muestreados, pueden generar los estados celulares “viables no cultivables” (VBNC), que van a requerir el uso de otras técnicas para una mejor estimación de los niveles de contaminantes microbianos en las muestras. Los VBNC representan una clara amenaza para la seguridad alimentaria, ya que el uso de análisis microbiológicos tradicionales basados en cultivos podría dar lugar a una subestimación o una interpretación errónea del estado microbiano del producto <sup>34</sup>.

Por otro lado, la tendencia de la automatización de los métodos de enumeración basados en cultivo reduce el tiempo necesario para realizar estos procedimientos analíticos, además han permitido reducir las necesidades de mano de obra, el costo de los materiales y mejorar el rendimiento <sup>27</sup>. Las máquinas de preparación de agar, los diluidores automáticos, los dispositivos de recuento y los dispositivos de placa en espiral para el esparcido, son algunos ejemplos de equipos que han hecho posible que los laboratorios procesen más muestras con mayor eficiencia <sup>27</sup>.



### 1.2.1.3 MÉTODOS DE CULTIVO PARA DETECCIÓN



Los métodos de cultivo de detección permiten determinar la prevalencia de los patógenos en la muestra. La detección en medios de cultivo líquido puede observarse como un cambio de color o de conductividad, impedancia y turbiedad en el caldo de cultivo. En medios de cultivo sólidos (agar) las UFC visibles indican crecimiento de células de los microorganismos que se pretenden detectar. En todo caso, la apariencia de los indicadores de crecimiento, es suficiente para que una persona competente pueda deducir la presencia de microorganismos viables en la muestra <sup>27</sup>.

Estos métodos constan de cuatro etapas: enriquecimiento; que puede incluir un enriquecimiento selectivo, screening (pruebas de detección), aislamiento y confirmación. Se explica brevemente cada etapa a continuación.

El enriquecimiento, también llamado pre-enriquecimiento, es el primer paso del cultivo y el objetivo es permitir la amplificación de la concentración del patógeno, sobretodo con la recuperación de microorganismos dañados o estresados (resucitación). Se realiza en medios líquidos donde se introduce la muestra y se lleva a incubación a la temperatura óptima de crecimiento. En esta etapa se resuelven algunos desafíos: convierte las muestras sólidas en suspensiones acuosas, aumenta la concentración del microorganismo objetivo y homogeniza la distribución. También, asegura que el éxito en las etapas siguientes, de screening y aislamiento, no dependa de la probabilidad de que las alícuotas de la suspensión de la





muestra contengan el patógeno objetivo <sup>18</sup>. Además, para detectar la presencia de células con daños; en mayor o menor grado, que pueden ser provocados por calentamiento, congelación, deshidratación, irradiación, acidificación, exposición a agentes desinfectantes, entre otros, es necesario introducir una etapa de revitalización o enriquecimiento <sup>32</sup>.

El enriquecimiento selectivo, que procede al anterior, promueve el desarrollo del microorganismo objetivo mientras que suprime o inhibe el desarrollo de los microorganismos competidores y flora acompañante, por ende, la selectividad del medio está provista de agentes o condiciones las cuales son antagonistas o inhibitorias de la flora acompañante. Estos agentes selectivos incluyen por ejemplo: temperatura, condiciones de pH, antibióticos, sales, ácidos y metales <sup>35</sup>.

La siguiente etapa puede ser el screening que va seguida del aislamiento. Las pruebas de screening, en el caldo de enriquecimiento no son obligatorias, se hacen para detectar la presencia de moléculas o de secuencias de genes del patógeno en cuestión, pero el objetivo del screening es reducir el número de muestras que necesitan continuar a la etapa de aislamiento, separando aquellas negativas para el patógeno. La finalidad de esta etapa no es la detección del patógeno en sí, ya que el caldo de enriquecimiento contiene una población mixta y se pueden producir falsos positivos que van a ser eliminados durante la etapa de aislamiento, la cual sí es obligatoria<sup>18</sup>. Generalmente, estas pruebas corresponden a técnicas cualitativas rápidas para detectar presuntivamente un microorganismo objetivo.



Posteriormente viene la etapa de aislamiento, que como se menciona anteriormente, es obligatoria y busca establecer un cultivo puro del patógeno de interés con UFC aisladas y separadas de los microorganismos acompañantes, de manera que no puedan provocar interferencia en la interpretación de los resultados durante la identificación (que será abordada en el numeral 1.2.2) <sup>18</sup>. La etapa de aislamiento comienza con un primer aislamiento en un medio de cultivo selectivo intentando obtener cultivos puros (aunque también pueden ser cultivos mixtos) y la misma se completa al conseguir un cultivo puro (seguido, si es necesario, de un segundo o tercer aislamiento) para obtener colonias puras presuntivas separadas del patógeno de interés en un medio de cultivo no selectivo <sup>18</sup>.

Finalmente, a los cultivos no selectivos, aislados y puros se les efectúan las pruebas de identificación y confirmación. Los resultados de estos métodos se informan como *detectado /no detectado* el microorganismo de interés en la porción de muestra analizada.





## 1.2.2 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN O DE CONFIRMACIÓN



Una tarea fundamental de los laboratorios de microbiología es la identificación de los microorganismos asociados con infecciones, en humanos o animales, asociados a procesos clínicos de infección y enfermedad. Un pilar primordial es la asignación de la especie a un aislamiento microbiano<sup>36</sup>. Igualmente, la confirmación es importante cuando se estiman parámetros de desempeño como falsos positivos o falsos negativos, sensibilidad y especificidad, especialmente en los métodos cualitativos, porque esta etapa confirma o rechaza los resultados obtenidos con el método evaluado<sup>11</sup>.

Una vez las colonias de los presuntivos han sido aisladas, se procede con la etapa de la confirmación o identificación a los sub-cultivos purificados, a los cuales se aplica un método para confirmar la identidad del microorganismo que generalmente es el patógeno de interés. Los métodos de confirmación pueden ir desde confirmación al nivel de familia y género, hasta métodos para confirmación / tipificación a nivel de género, especie y de serovares<sup>37</sup>. Cada uno de los métodos escogidos tienen diferente sensibilidad, lo cual es determinante para la correcta asignación de la identidad del presuntivo y que, a su vez, va a repercutir en la sensibilidad del método analítico bajo estudio. Hay varios métodos de identificación o confirmación, pero los más usados son: los de identificación fenotípica o tradicional y serotipificación, los métodos genotípicos y los métodos basados en proteómica<sup>36</sup>.

Los métodos tradicionales fenotípicos, se basan fundamentalmente en la comparación de las características fenotípicas (observables como morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas y metabólicas) de bacterias desconocidas con aquellas de cultivos tipo (de referencia). Por esto es de gran relevancia la experiencia del microbiólogo, encargado de la elección de la o las pruebas, la ejecución de manera secuencial de las mismas, así como la interpretación de los resultados<sup>36</sup>. En ningún caso, los métodos de identificación fenotípica pueden proporcionar una certeza absoluta, únicamente indicarán cuál es el género y/o la especie a la que el microorganismo identificado tiene mayor probabilidad de pertenecer<sup>36</sup>.

Los métodos genotípicos, por su parte, permiten superar las limitaciones de los métodos fenotípicos (por ejemplo, no todas las cepas de una misma especie presentan características homogéneas) identificando genes conservados para establecer relaciones entre bacterias y genes que permitan mayor diferenciación intra-especies en grupos, biovariedades, genovariedades, etc. <sup>36</sup>. Estos métodos genotípicos se basan en la amplificación genómica y/o en la secuenciación de esos genes o sus fragmentos y son muy usados cuando hay dificultades con el aislamiento, crecimiento lento, baja actividad en las pruebas bioquímicas, baja efectividad en las pruebas serológicas, entre otras. Además, permiten obtener resultados reproducibles y en ocasiones más rápidos que los tradicionales <sup>36</sup>.

El otro grupo de métodos, son los proteómicos, se basan en el estudio y la caracterización de un conjunto de proteínas expresadas por el microorganismo bajo estudio. Según el objetivo del estudio, hay técnicas para analizar globalmente el proteoma, como la electroforesis, técnicas para analizar individualmente las proteínas, como espectrometría de masas (Ejemplo MALDI-TOF)<sup>36</sup>, los inmunoensayos, entre otros.



## 1.3 EL MATERIAL DE REFERENCIA EN MICROBIOLOGÍA



Un material de referencia (MR) se define como un material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas <sup>38</sup>, por otro lado, un material de referencia certificado (MRC) corresponde a un material de referencia acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos <sup>38</sup>. Los valores de propiedad se obtienen a través de la caracterización, como se describe en la norma ISO 17034:2016 y ISO/ Guide 35: 2017 <sup>39</sup>.

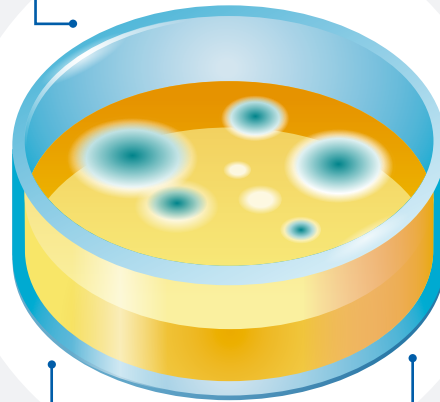
Si bien en el campo de las mediciones en física y química existen MR y MRC bien entendidos y caracterizados, la necesidad de garantizar la comparabilidad de los resultados de medición en microbiología ha hecho necesario el desarrollo de materiales que garanticen dicha comparabilidad. Sin embargo, los MR y MRC en microbiología presentan algunos desafíos adicionales, teniendo en cuenta que los analitos de interés son organismos vivos y las referencias de medición deben estar orientadas a garantizar las características de la identidad del microorganismo (en el caso de ensayos cualitativos) y de cantidad o concentración (en el caso de ensayos cuantitativos). A continuación, algunas definiciones para ampliar el entendimiento de estas características en microbiología <sup>40</sup>:

# 1. Cepa

Células que descienden de un único aislamiento de un cultivo puro, por lo general a partir de una sola colonia, aunque no necesariamente de una sola célula (es decir, no necesariamente un clon).

# 2. Autenticación

Proceso de comparación de las características de una cepa para determinar o verificar la identidad.



# 3. Identidad

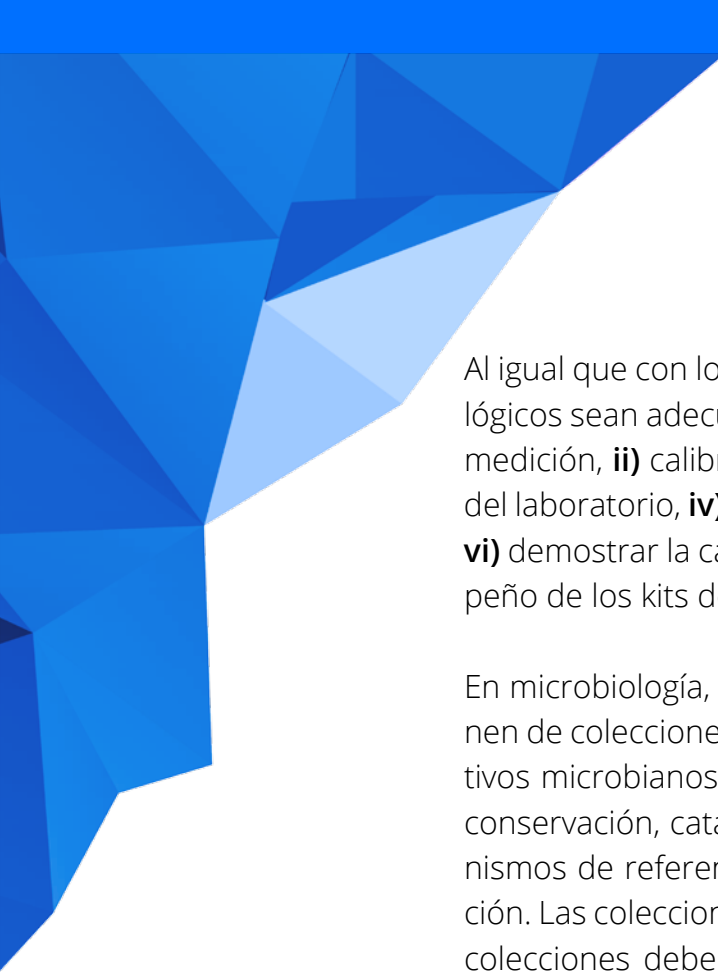
Es la identificación de un microorganismo y proporciona el nombre del microorganismo (a nivel de género o especie)

# 5. Cantidad

Es la enumeración o recuento del microorganismo (directo/ indirecto)

# 4. Caracterización o tipificación

Esto agrupa organismos que comparten patrones de fragmentos de ADN o perfiles antigénicos similares. Es el proceso de someter una cepa a una serie de pruebas morfológicas, fisiológicas, moleculares o/y otras.



Al igual que con los MR físicos o químicos, se requiere que los MR microbiológicos sean adecuados para: **i)** demostrar la exactitud de los resultados de medición, **ii)** calibrar equipos de laboratorio, **iii)** monitorear el desempeño del laboratorio, **iv)** validar métodos, **v)** permitir la comparación de métodos, **vi)** demostrar la calidad de los medios de cultivo o **vii)** demostrar el desempeño de los kits de ensayo <sup>6</sup>.

En microbiología, los MR son las cepas o cultivos de referencia que provienen de colecciones de microorganismos certificadas, las colecciones de cultivos microbianos se centran en la adquisición, autenticación, producción, conservación, catalogación y distribución de cultivos viables de microorganismos de referencia, líneas celulares y otros materiales para la investigación. Las colecciones de cultivos también son depósitos de cepas tipo. Estas colecciones deben estar reconocidas y registradas como miembro de la Federación Mundial de Colección de Cultivos (WFCC) o de la Organización de Colecciones de Cultivo Europea (ECCO), las cuales garantizan que el material esté bien caracterizado en diferentes niveles (género, especie, subespecie e incluso serotipo), catalogado y descrito acorde con sus características <sup>41</sup>. La WFCC es una comisión multidisciplinar de la Unión Internacional de Ciencias Biológicas (UICB) y una federación dentro de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología (IUMS). La WFCC se ocupa de la recogida, autenticación, mantenimiento y distribución de cultivos de microorganismos y células cultivadas. Su objetivo es promover y apoyar la creación de colecciones de cultivos y servicios relacionados, proporcionar un enlace y establecer una red de información entre las colecciones y sus usuarios, organizar talleres y conferencias, publicaciones y boletines informativos y trabajar para garantizar la perpetuación a largo plazo de las colecciones importantes <sup>42</sup>.

En cuanto a la trazabilidad, vale la pena aclarar que en microbiología se deben distinguir dos tipos de trazabilidad: una referida a la rastreabilidad del origen de la cepa, es decir a la colección biológica donde se encuentra depositado el espécimen y otra que es la trazabilidad metrológica referida a la propiedad del resultado analítico. A continuación, se amplían un poco estos conceptos.

La trazabilidad (referida a la rastreabilidad) de estos materiales está dada hacia la identidad del microorganismo, que es una propiedad cualitativa. Por lo anterior, el MR es trazable al cultivo de origen (cultivo de colección), el cual posee una identidad confirmada (genotípica y fenotípica), características bien definidas, así como una cadena de custodia totalmente documentada. Cuando no se dispone de cultivos de referencia trazables, es posible emplear derivados comerciales trazables a estos, siempre y cuando las propiedades relevantes para el uso previsto hayan sido demostradas equivalentes por el laboratorio<sup>6</sup>.

Cuando la trazabilidad metrológica no es técnicamente posible al sistema internacional de unidades (SI), como es el caso de microbiología, la forma de cumplir satisfactoriamente este requerimiento es: a) usando valores certificados de materiales de referencia certificados producidos por proveedores competentes, b) documentar los resultados de la medición a métodos de referencia adecuados, específicos o definidos por consenso que entreguen resultados ajustados al uso previsto (la evidencia de comparación de esta medición será solicitada por el organismo de acreditación competente)<sup>43</sup>.

Se considera que la trazabilidad de una medición microbiológica se puede demostrar de manera indirecta a través de la trazabilidad de los equipos empleados y del aseguramiento de la calidad de los resultados, a través del uso de cepas de referencia o cultivos de colecciones microbiológicas de referencia.

Las cepas de referencia son necesarias para demostrar que los medios poseen unas características aceptables, para validar métodos y para controlar que se mantienen sus características. La trazabilidad es necesaria, por ejemplo, al establecer las características de los medios utilizados en kits de análisis y validaciones de métodos. Para demostrar la trazabilidad, el laboratorio debe utilizar cepas de referencia de microorganismos obtenidos directamente de una colección nacional o internacional reconocida,



cuando exista alguna. Alternativamente, también podrían utilizarse cepas comerciales siempre que el laboratorio pueda demostrar en el momento de su uso que todas las propiedades relevantes son equivalentes <sup>6</sup>.

Por otro lado, los MRC empleados en ensayos cuantitativos, disponen de un valor de concentración (usualmente en UFC) y una incertidumbre declaradas, estos pueden ser caracterizados para identidad y cantidad (concentración), esta última asignación la puede hacer el proveedor con sus métodos de ensayo, o a partir de ejercicios interlaboratorio donde el valor de consenso, posterior al tratamiento estadístico, corresponde al valor asignado. La trazabilidad en este caso, sí se denomina trazabilidad metrológica y está dada al procedimiento de medición empleado para la asignación del valor del material <sup>44</sup>.

La trazabilidad metrológica es una característica de un resultado de medición y consta de dos partes: la identidad claramente definida del mensurando y la trazabilidad de los valores de propiedad de ese mensurando. Por lo tanto, establecer la trazabilidad incluye tanto la prueba de identidad de la propiedad medida como la comparación de los resultados con una referencia declarada apropiada. La comparación se establece asegurando que, los laboratorios sean capaces de adelantar manera adecuada la evaluación de desempeño de los procedimientos de medición y la ejecución de la calibración de los equipos, además, que las condiciones de medición (como la preparación del material de prueba, las condiciones ambientales, etc.) estén bajo control suficiente para proporcionar un resultado confiable <sup>45</sup>.

Todos los materiales deben venir acompañados de un documento, en el caso de los MR es una hoja de información y en el caso de los MRC es el certificado. La mínima información que debe contener el certificado de acuerdo con la Guía 31 es <sup>46</sup>: **i)** Nombre del material, donde generalmente se debe especificar la identidad del microorganismo, **ii)** Código y número de lote, **iii)** Valor certificado y su incertidumbre, **iv)** uso previsto, **v)** instrucciones de uso, **vi)** métodos analíticos empleados en su caracterización, junto con los laboratorios participantes, **vii)** trazabilidad, entre otros. Para información detallada del certificado revisar ISO / Guía 31 de 2000.

**Nota:** no todos los productores de material de referencia siguen los lineamientos de las guías relacionadas, por lo que aún se encuentra una heterogeneidad en la información que presentan en sus certificados. Por ejemplo: algunos MR se envían acompañados de un documento titulado como *certificado de análisis* que induce a la confusión del usuario del material.

Existen otras alternativas, en relación con el acceso a materiales, que se pueden emplear y pueden ser:

- *Ítems de ensayo provenientes de ensayos de aptitud o ejercicios interlaboratorio*, que le permite comparar los resultados del laboratorio contra el valor asignado para el ítem de ensayo en el ensayo de aptitud, empleando el mismo método de ensayo para evitar sesgos no corregidos por diferencias en los métodos de medición.
- Muestras fortificadas con cantidades conocidas de cepas / cultivos de referencia.
- Materiales de referencia *in house*: aquellos preparados por el laboratorio, donde se ha demostrado que son lo suficientemente homogéneos y estables para ser empleados como herramientas de control de la calidad en el flujo de trabajo del laboratorio <sup>47</sup>.

Vale la pena aclarar que, los MRC son producidos por productores de materiales de referencia acreditados y están disponibles comercialmente. Sin embargo, los materiales para control de calidad se suelen preparar por un laboratorio para su propio uso interno. Con frecuencia, estos materiales usados para control de calidad se caracterizan sólo para un alcance limitado (un número limitado de valores de propiedad) y para aplicaciones específicas del laboratorio, di-



chos materiales no requieren una caracterización mediante procedimientos metrologicalmente válidos, y se pueden preparar “internamente” (in-house), es decir, por personal del laboratorio familiarizado con su comportamiento.

En relación con la disponibilidad de MR/MRC microbiológicos, existen diferentes bases de datos que se relacionan en la tabla a continuación:

**Tabla 1.:** Proveedores de materiales de referencia y materiales de referencia certificados (MR y MRC) de microbiología.

Nombre de la base de datos	Descripción	Sitio web
La División Técnica de Materiales de Referencia (TDRM por sus siglas en inglés)	Filial de AOAC, dispone de una base de datos con MR provenientes de Institutos Nacionales de Metrología así como productores acreditados en ISO 17034	<a href="http://tdrmdb.aoac.org/">http://tdrmdb.aoac.org/</a>
Código de Indexación de Materiales de Referencia – COMAR (por sus siglas en francés)	Es una de las bases más grandes, creada por el Laboratorio Nacional de Metrología francés en 1970, actualmente administrada por el Instituto Federal de Investigaciones y Ensayo de Materiales (BAM) alemán. Dispone de un listado de más de 7000 materiales de referencia indexados por nombre, descripción, propiedades físicas, convencionales, campos de aplicación, forma y composición. La consulta en la base de datos requiere de un registro previo	<a href="https://rrr.bam.de/RRR/Navigation/EN/Reference-Materials/COMAR/comar">https://rrr.bam.de/RRR/Navigation/EN/Reference-Materials/COMAR/comar</a>
El Centro de Investigación adjunta (JRC por sus siglas en inglés) de la Unión Europea	Dispone de un listado de más de 800 MRC producidos por este centro, entre los cuales se encuentran varios MRC microbiológicos, a nivel de identidad así como para propiedades cuantitativas.	<a href="https://crm.jrc.ec.europa.eu">https://crm.jrc.ec.europa.eu</a>
FAPAS	Uno de los proveedores de programas de ensayos de aptitud (EA) más reconocidos a nivel mundial dispone de un catálogo de materiales de referencia y materiales control de calidad, los primeros con incertidumbres y trazabilidades establecidas, los segundos a partir de los materiales empleados en diferentes EA, donde disponen de un valor asignado y un intervalo de desempeño en términos de Z score.	<a href="https://fapas.com/shop/browse/2">https://fapas.com/shop/browse/2</a>

Nombre de la base de datos	Descripción	Sitio web
La Oficina de Referencia Alemana para Ensayos de Aptitud y Materiales de Referencia (DRRR por sus siglas en Alemán)	Ofrece materiales de referencia similares a los controles de calidad de FAPAS, producto de los ítem de ensayo empleados en los Ensayos de Aptitud ofrecidos.	<a href="https://drrr.de/en/reference-materials/microbiology/">https://drrr.de/en/reference-materials/microbiology/</a>
LGC Standards es una división de LGC Group	De LGC Group que es el Instituto Nacional designado del Reino Unido para mediciones químicas y bioanalíticas. Son fabricantes y proveedores de servicios de herramientas de investigación y para control de calidad como materiales de referencia y ensayos de aptitud. Son materiales acreditados según ISO 17034.	<a href="https://www.lgcstandards.com/PL/en/Food-and-Beverage/Microbiology/cat/279643">https://www.lgcstandards.com/PL/en/Food-and-Beverage/Microbiology/cat/279643</a>
Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC por sus siglas en inglés)	Dispone de un listado de MR a nivel tanto de los microorganismos como de metabolitos de interés como los son ácidos nucleicos.	<a href="https://www.atcc.org/microbe-products/collections-and-projects/certified-reference-materials?matchtype=&amp;network=g&amp;device=c&amp;adposition=&amp;keyword=&amp;gclid=CjwKCAiA24SPBhB0EiwAjBgkhljdFNUDq2NErydTO6FsI17u0HC576PjMwVwZ0zAwSsZ2rgmWulfwhoC-fgQAvD_BwE#t=productTab&amp;numberOfResults=24">https://www.atcc.org/microbe-products/collections-and-projects/certified-reference-materials?matchtype=&amp;network=g&amp;device=c&amp;adposition=&amp;keyword=&amp;gclid=CjwKCAiA24SPBhB0EiwAjBgkhljdFNUDq2NErydTO6FsI17u0HC576PjMwVwZ0zAwSsZ2rgmWulfwhoC-fgQAvD_BwE#t=productTab&amp;numberOfResults=24</a>
La Agencia Nacional de Alimentos de Suecia.	Ofrece servicios de Ensayos de Aptitud y Materiales de Referencia	<a href="https://www.livsmedelsverket.se/en/business-legislation-and-control/laboratory-activities-and-scientific-support/microbiological-reference-materials#Reference_material_Food">https://www.livsmedelsverket.se/en/business-legislation-and-control/laboratory-activities-and-scientific-support/microbiological-reference-materials#Reference_material_Food</a>
EL Comité Adjunto para Trazabilidad en Laboratorios Clínicos (JCTLM por sus siglas en inglés)	Dispone de una base de datos con Materiales de referencia, métodos de medición y servicios de medición orientados a los laboratorios clínicos, aunque no se listan MR microbiológicos, disponen de MR aplicables a nivel de química clínica que eventualmente podrían emplearse para estudios de comparación.	<a href="https://www.bipm.org/jctlm/home.do">https://www.bipm.org/jctlm/home.do</a>
NSI Lab Solutions	NSI Lab Solutions Productor de Materiales de referencia certificados (CRM) para química y microbiología de alimentos: materiales de referencia cultivos de patógenos (STEC, L. monocytogenes, Salmonella), indicadores microbiológicos CRM para métodos Petrifilm™ y BAM y materiales de referencia para alérgenos. Hisopos de cultivo SNAP-Stick™. Programa acreditado de pruebas de competencia en química y microbiología de alimentos ISO 17043.	<a href="https://www.nsilabsolutions.com/product-category/food/microbiological-food/single_strain_crm-microbiological-food/">https://www.nsilabsolutions.com/product-category/food/microbiological-food/single_strain_crm-microbiological-food/</a>

Institutos nacionales de metrología	Con capacidad para desarrollar materiales de referencia de esta naturaleza	Sitio web
Instituto Nacional de Tecnología Industrial de Argentina- INTI	<p>El Laboratorio Nacional de Referencia y su Sistema Integrado conformado por el Sistema Centralizado de Calibración (SICECAL) y la Red Argentina de Laboratorios Lácteos de Calidad Asegurada (REDELAC), proveen a los laboratorios distintas herramientas y servicios para el aseguramiento de la validez de los resultados.</p> <p>El SICECAL es nuestro sistema de producción de materiales de referencia (MR) y materiales de referencia certificados (MRC) en distintas matrices</p>	<a href="https://www.inti.gob.ar/areas/metrologia-y-calidad/metrologia-quimica/sicecal/mrc-mr/">https://www.inti.gob.ar/areas/metrologia-y-calidad/metrologia-quimica/sicecal/mrc-mr/</a>
Biosisto	<p>Biosisto es un laboratorio designado del gobierno para la Autoridad de Seguridad de Alimentos y Productos de Consumo del Gobierno Holandés.</p>	<a href="https://www.biosisto.com">https://www.biosisto.com</a>
Proveedores comerciales	Quienes distribuyen MR y controles de calidad provenientes de productores acreditados	Sitio web
Merck (Sigma Aldrich)	<p>Distribuye discos VITROIDS™ y LENTICULE® de Supelco® que están especialmente desarrollados para controles microbiológicos. Tiene licencia de la Colección Nacional de Cultivos Tipo (NCTC®)/Colección Nacional de Hongos Patógenos (NCPF®) y la Colección de Cultivo Tipo Española (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT®).</p>	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/products/analytical-chemistry/reference-materials/microbiology-standards?gclid=CjwKCAiA24SPBhB0EiwAjBgkhu80jKyGRP1b-FnkS2TGlhBgmZY6SwoH9JjxEnH_P66ExJN-MimVjrcRoCX4oQAvD_BwE#bacteria">https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/products/analytical-chemistry/reference-materials/microbiology-standards?gclid=CjwKCAiA24SPBhB0EiwAjBgkhu80jKyGRP1b-FnkS2TGlhBgmZY6SwoH9JjxEnH_P66ExJN-MimVjrcRoCX4oQAvD_BwE#bacteria</a>
Microbiologics	<p>Distribuye MR y MRC. Epower® MRC viene con un certificado de análisis integral que detalla la identidad, las características y la desviación estándar de las cepas.</p>	<a href="https://www.microbiologics.com/item-type/Product/product-format/Epower-CRM">https://www.microbiologics.com/item-type/Product/product-format/Epower-CRM</a>

Proveedores comerciales	Quiénes distribuyen MR y controles de calidad provenientes de productores acreditados	Sitio web
Emerald scientific	Distribuye MR y MRC proveniente de NSI Lab Solutions y The Emerald Test™, y el programa de prueba de competencia de comparación entre laboratorios desarrollado específicamente para laboratorios de prueba de cáñamo y cannabis	<a href="https://emeraldscientific.com/reference-materials/microbiology/certified-reference-materials/">https://emeraldscientific.com/reference-materials/microbiology/certified-reference-materials/</a>
Colección Nacional de Cultivos Tipo (NCTC) del Reino Unido	Dispone de un listado de MR procariotas, DNA bacteriano, bacteriófagos, entre otros.	<a href="https://www.culturecollections.org.uk/products/index.aspx">https://www.culturecollections.org.uk/products/index.aspx</a>

Fuente: Elaboración propia

## 1.4 CONSIDERACIONES PARTICULARES DE LA MEDIDA EN MICROBIOLOGÍA

### »»

Al igual que otros procesos de medida, en microbiología hay algunas características particulares que deben ser consideradas al momento de medir:

**1. Naturaleza del analito:** el analito, el objeto de medida o de examen es un ser vivo, cuya implicancia en una muestra de alimento puede: **1)** constituir un riesgo para la salud de las personas si es clasificado como un microorganismo patógeno y/o productor de toxinas que puede provocar una enfermedad transmitida por los alimentos o, **2)** si es microorganismo indicador de calidad que puede afectar principalmente la calidad y vida útil de alimento, ya sea provocando el deteriorando o produciendo cambios no deseables.



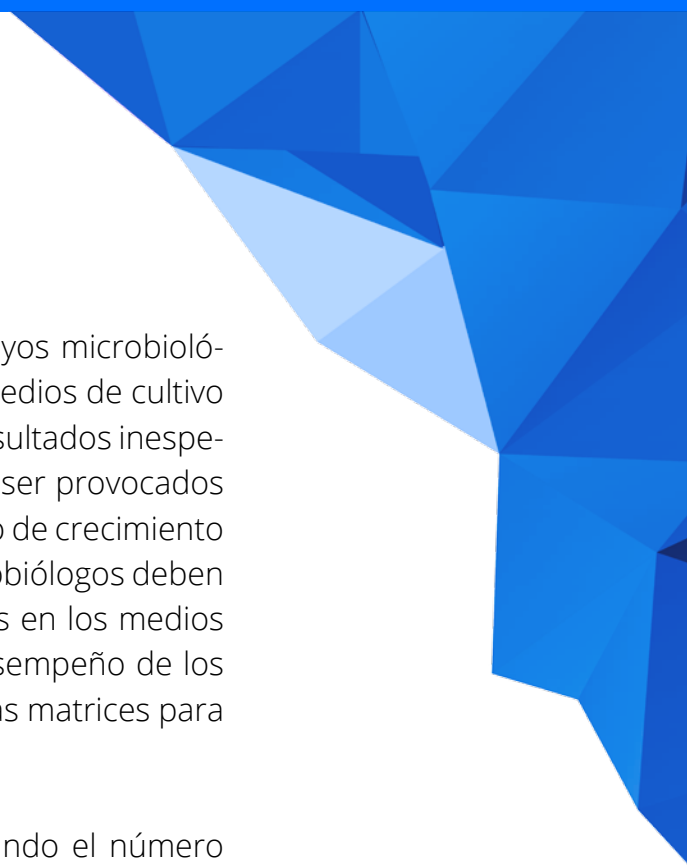
Es por ello, que se deben considerar algunas particularidades, como son: taxonomías imprecisas que pueden conducir a la separación o agrupamiento impreciso de microorganismos (desde el punto de vista taxonómico); el comportamiento de los individuos de un grupo ya que generalmente se evalúan los individuos con comportamientos típicos pero no se debe obviar la existencia de los individuos no típicos; dificultades para garantizar la estabilidad de las muestras por largos periodos de tiempo, debido tanto al crecimiento o a la muerte de los microorganismos en las muestras; la presencia o ausencia de microorganismos acompañantes en las muestras; las concentraciones pequeñas de microorganismos en las muestras y la distribución de estos<sup>48</sup>, además, de la considerable capacidad de variaciones genéticas y mutaciones<sup>25</sup>, entre otras.

**2. Distribución de la población:** la distribución de los microorganismos no es uniforme, es decir, es heterogénea, caracterizándose como una distribución de Poisson. Dada la dificultad de realizar recuentos por encima de 300 UFC (ver ISO 7218), es necesario garantizar una concentración inferior en las placas de cultivo, sin embargo, los recuentos en microbiología no siempre tienen una distribución normal, así que, para obtener una distribución más cercana a la normal, los recuentos son transformados a logaritmo decimal<sup>1</sup>. Para conteos pequeños (<20 UFC), no es aplicable el modelo de distribución normal, por lo que se requiere aplicar funciones de distribución de Poisson o binomial negativa<sup>49</sup>, lo que hace necesario el uso de tratamientos estadísticos diferentes para establecer valor de población y sus límites de confianza. En lo posible, la ISO 13843 recomienda que independientemente del método de preparación de las muestras, se debe prestar atención a la práctica de homogeneización para facilitar la distribución aleatoria de los microorganismos en la muestra<sup>11</sup>.

**Tabla 2:** Relación entre las distribuciones espacial y de frecuencia de los microorganismos en los alimentos.

Distribución espacial (relativa al azar uniforme)	Distribución de frecuencias (relativa a Poisson)			Ejemplo
<b>Más espaciado</b> (casi regular)	más concentrado	sub-dispersión	varianza < media	Un patrón de contaminación regular puede ser el resultado de eventos de contaminación en el proceso de producción, por ejemplo, un cabezal de llenado contaminado. Como consecuencia, la contaminación regular se caracteriza por una alta prevalencia de unidades contaminadas en el lote y una baja variabilidad en la concentración.
<b>Uniforme aleatorio</b>	Poisson		varianza = media	Un patrón de contaminación aleatorio suele ser el resultado de una mezcla completa o cuando los eventos de contaminación ocurren al azar (contaminación homogénea).
<b>Más agrupado</b>	más sesgado a la derecha	Sobre-dispersión	varianza > media	Un patrón de contaminación agrupada puede ser el resultado de un evento de contaminación seguido de cierto crecimiento del organismo y mezcla limitada del producto. Como resultado, las células individuales no se distribuyen ampliamente a través de los alimentos. Como consecuencia, la prevalencia de unidades contaminadas en el lote puede ser baja y la variabilidad en la concentración puede ser alta.

Fuente: 50, 51



**3. Sistemas de detección:** en los métodos de ensayos microbiológico, el sistema de detección está definido por los medios de cultivo (detectores) y, en ocasiones, estos pueden presentar resultados inesperados causados por los organismos vivos o pueden ser provocados por efectos de la matriz, por ingredientes del sustrato de crecimiento o por los microorganismos acompañantes. Los microbiólogos deben ser capaces de reconocer y entender estos cambios en los medios de cultivo<sup>49</sup>, de allí que es obligatorio evaluar el desempeño de los detectores<sup>31</sup> y es aconsejable conocer el efecto de las matrices para disminuir esas interferencias.

Otro punto importante, es tener presente que cuando el número de microorganismos es muy bajo, no es la capacidad del método para detectar el microorganismo lo que determina el resultado del ensayo, sino la probabilidad de que una célula estuviera realmente presente en la unidad analítica analizada. Por ende, independiente de la homogeneización, la selección de una alícuota implica un elemento de aleatoriedad y, por lo tanto, una probabilidad de que se encuentre un número diferente de organismos en cada muestra o submuestra.

**4. Muestreo o toma de muestra:** etapas anteriores a la medición, como el muestreo o toma de muestra, han demostrado que influyen fuertemente sobre los resultados de los análisis, por ejemplo, los microorganismos patógenos son difíciles de detectar porque se encuentran en bajas concentraciones, tienen una distribución heterogénea en la muestra y en algunos casos pueden estar dañados o estresados a causa de las condiciones de producción de los alimentos o de tratamientos aplicados a la muestra. Esta es la principal razón para someter las muestras a etapas de “enriquecimiento” o “revitalización” que mejoren la detección y es anterior a las etapas de enumeración (en algunos casos)<sup>15</sup>.

El muestreo y transporte debe ser realizado apropiadamente, las muestras de laboratorio deben ser representativas del lote entero, deben protegerse contra la contaminación externa y el manejo inadecuado, especialmente a las temperaturas que pueden alterar significativamente la microbiota. Asimismo, las muestras que se reciben en el laboratorio deben ser analizadas dentro de los tiempos establecidos según el tipo de producto <sup>52</sup>.

**5. Reporte de resultados:** en el caso de los métodos cualitativos, el resultado se informa cómo detectado o no detectado, en el caso de los métodos cuantitativos se informan las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) o el Número más Probable (NMP). Las unidades deben referir a una unidad de volumen (mL) o de masa (g) según corresponda.

Estos son en realidad una aproximación al número de unidades reales de la muestra, a diferencia de los métodos directos, como microscopía o citometría de flujo, que cuentan células individuales que se reportan como Células de Bacteria Individuales (IBC por sus siglas en inglés) <sup>53</sup>.

Sin embargo, no hay un consenso aún sobre una equivalencia entre UFC e IBC que contribuya a armonizar los resultados obtenidos por diferentes técnicas. Los resultados son método dependiente y obliga a hacer trazables los resultados de medición a un procedimiento de medición antes que a una referencia más general (como una unidad del Sistema Internacional).







# Capítulo 2



ADECUACIÓN DE USO DE LOS MÉTODOS  
MICROBIOLÓGICOS.



La adecuación de uso de los métodos está relacionada con el grado en que los requisitos analíticos establecidos y las características de desempeño evaluadas permiten garantizar el cumplimiento del propósito definido para el método de ensayo, por ejemplo, frente a los requisitos de un cliente.

En general, la guía de Eurachem de adecuación de uso de los métodos analíticos plantea seis principios que vale la pena recordar<sup>10</sup>:

- 1.** Las medidas analíticas deberían realizarse para satisfacer un requisito acordado" (ej.: con un objetivo definido).
- 2.** Las medidas analíticas deberían realizarse con métodos y equipos que previamente han sido probados para asegurar su adecuación al uso.
- 3.** El personal que realiza medidas analíticas debería estar calificado y ser competente para realizar sus tareas (y demostrar que pueden realizar correctamente los análisis).
- 4.** Debería existir una evaluación periódica e independiente del desempeño técnico de un laboratorio.
- 5.** Las medidas analíticas realizadas en un lugar deberían ser consistentes con las realizadas en otros lugares.
- 6.** Las organizaciones que realizan medidas analíticas deberían definir procedimientos adecuados de control y de aseguramiento de calidad.

En el caso de los ensayos microbiológicos, el propósito generalmente está dirigido a la detección, identificación y/o cuantificación de un microorganismo o conjunto de microorganismos, a nivel de género, especie o serotipo. Por lo tanto, antes de aplicar un método de ensayo, es necesario garantizar que se cumplen los requisitos analíticos con la evaluación de los parámetros y características de desempeño y demostrar así, que el método es adecuado para el uso que va a tener en el laboratorio y cumplir con los requisitos del cliente <sup>54</sup>.

En este sentido, antes de que un método pueda ser usado en el laboratorio, con el objeto de producir resultados confiables y adecuados para el propósito <sup>55</sup>, se requiere realizar la validación o la verificación del método (Tabla 3).

**Tabla 3:** Definiciones de validación y verificación

	VIM <sup>38</sup>	ISO 16140 <sup>2</sup>	FDA <sup>8</sup>
<b>Validación</b>	Una verificación que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto (2.45)	El establecimiento de las características de desempeño de un método y la aportación de evidencia objetiva que los requisitos de desempeño para un uso previsto se cumplen (2.81)	Confirmación por examinación y provisión de evidencia objetiva de que los requisitos particulares para el uso previsto se han cumplido (1.6)
<b>Verificación</b>	La aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados (2.44)	La demostración que el desempeño del método validado, en el laboratorio del usuario, está de acuerdo con las especificaciones determinadas en el estudio de validación y que se ajusta al propósito del uso previsto (2.83)	Confirmación por examinación y la provisión de evidencia objetiva que los requisitos especificados para el desempeño de un método se han cumplido por un laboratorio individual. (4.1.2)

**Fuente:** Elaboración propia

Si bien el lenguaje es diferente, es claro que la validación como primera etapa, está dirigida a establecer los requisitos analíticos que van a definir las características de desempeño que el método debe estar en capacidad de cumplir para cubrir los requisitos especificados o el fin previsto, y una vez comprobados, constituirán esa evidencia objetiva requerida. Por otro lado, la verificación, como segunda etapa, sólo puede ser aplicada sobre métodos que ya han sido validados, obedece a demostrar su rendimiento de manera objetiva, es decir, a través de algún tipo de trabajo experimental en una extensión menor

que el requerido en la validación y demostrará que el laboratorio está en capacidad de ejecutar el método de ensayo cumpliendo con los requisitos establecidos en la etapa de validación.

Una característica importante en la definición de FDA es el término “examination” en español “examen”, que VIM en la versión 3, también aconseja el uso para referirse a propiedades cualitativas, aquellas que no se expresan en cantidad, por ejemplo, cambios de color. De manera que, una medida de “examen” aplica para referirse a las propiedades nominales que se examinan a través de métodos cualitativos<sup>38</sup>.

Por otro lado, la norma ISO 15189 e ISO/Guía 35, usan la expresión tanto para propiedades nominales como para mediciones de cantidades (métodos de medición), de igual manera que es abordado por FDA lo que está muy relacionado con ensayos microbiológicos cuantitativos y cualitativos.

## 2.1 ¿VALIDAR O VERIFICAR?

### 2.1.1. VALIDACIÓN



De acuerdo con ISO/IEC 17025 (numeral 7.2.2.1)<sup>19</sup> la validación se debe hacer en el caso en que el laboratorio use:

- **Métodos no normalizados, como, por ejemplo:**
  - Métodos descritos en publicaciones científicas, empleados a nivel experimental como parte de proyectos o actividades de investigación.
  - Métodos desarrollados en otras organizaciones o guías sectoriales con el objetivo de ser implementadas por los laboratorios de ese sector.
  - Métodos reconocidos a nivel nacional, ejemplo: método de recuento de esporas de clostridium sulfito reductores de INVIMA.

- **Métodos desarrollados por el laboratorio.**
- **Métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificados de otra forma.**
  - Métodos que están implementados y en ocasiones acreditados dentro de los laboratorios y por solicitud de los clientes se usan con matrices que no están dentro del alcance de la validación, ejemplo:
    - Recuento de *Bacillus cereus* en jugos UHT
    - *Listeria monocytogenes* en agua

La validación aplica también cuando es necesario demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos por dos métodos, por ejemplo: un método recientemente desarrollado y un método normalizado existente <sup>6</sup>. En resumen, la validación debe ser tan amplia como sea necesaria, para satisfacer las necesidades de aplicación dadas y es la verificación de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto <sup>38</sup>.

## 2.1.2. VERIFICACIÓN



El laboratorio debe verificar, es decir, aportar evidencia objetiva que un elemento dado satisface los requisitos especificados <sup>38</sup>, por tanto, que el laboratorio puede llevar a cabo apropiadamente los métodos antes de utilizarlos, asegurando que se pueda lograr el desempeño requerido (ISO / IEC 17025:2017. 7.2.1.5). Así mismo, la ISO 15189 hace hincapié en que “*los procedimientos de examen usados sin modificaciones deben estar sujetos a una verificación independiente antes de ser usados como métodos de rutina*”. En este sentido, los métodos a verificar son:

- **Los métodos normalizados**
- **Los métodos alternativos validados**

**Nota:** La verificación sólo es aplicable a los métodos que han sido validados mediante un estudio entre laboratorios <sup>55</sup>. Sin embargo, como alternativa para métodos que no han sido completamente validados y que no disponen de datos de interlaboratorio, se propone la “verificación de ítem” (ver anexo F, ISO 16140-3). Ver capítulo 4 de esta guía.

Los métodos normalizados, o de referencia, son aquellos publicados por organismos internacionales, ampliamente reconocidos y aceptados; en microbiología incluyen aquellos métodos publicados por ISO, AOAC, NMKL, CEN, DIN, métodos normalizados de entidades regulatorias como USDA, FDA, OIE; así como otros métodos normalizados equivalentes regional o nacionalmente. También se consideran normalizados aquellos métodos investigados a fondo, los cuales describen las condiciones y procedimientos para la medición de una o más propiedades, son el resultado de ejercicios colaborativos donde se han evaluado las características de desempeño del método por un conjunto de laboratorios competentes para el ensayo; por lo que sirven como referencia para evaluar el desempeño de otros métodos para la misma medición <sup>56</sup>.

Por otro lado, debido a los requerimientos de muchos de los ensayos normalizados para su implementación en un laboratorio independiente, especialmente en términos de reactivos, muestras, tiempo de implementación y ejecución, entre otros, se dió lugar al desarrollo de métodos alternativos por parte de organizaciones comerciales, con marcas registradas usualmente patentados denominados “proprietary method” por su traducción del inglés <sup>2</sup>. Estos a menudo resultan más rápidos, más fáciles de usar y son susceptibles de automatización, los cuales se distribuyen comercialmente como métodos rápidos o kits diagnósticos, que reducen el tiempo para la obtención del resultado y optimizan la eficiencia del flujo y el manejo de muestras múltiples.



Para estos métodos de análisis rápidos (comerciales o no) que detectan y/o cuantifican, en una determinada categoría de matrices, el mismo analito que es detectado y/o cuantificado por el método de referencia<sup>2</sup>, generalmente el proceso de validación ya fue realizado por el fabricante y ha sido reconocido por un tercero como:

**AFNOR** (AFNOR - NF Validation)

<https://nf-validation.afnor.org/en/nf-validation/>

**AOAC** (Research Institute)

<https://www.aoac.org/scientific-solutions/research-institute-ptm/>

**DIN, ENNAS, CEN** (MicroVal)

<https://microval.org/>

**NMKL - NordVal**

<https://nmkl.org/index.php/nb/nordval>

Entre otros, para el analito y alcance de aplicación.

La introducción de los métodos alternativos para detección o cuantificación, son generalmente más baratos de usar, producen resultados más rápido que los métodos de cultivo tradicionales y son más simples de realizar ya que requieren menos habilidades técnicas. Estas características hicieron que se tornaran muy populares en la industria de alimentos y en los laboratorios de control, además de convertirse en los preferidos sobre los métodos de referencia tradicionales para los análisis de rutina. Por esto, es importante que el laboratorio revise para cada uno de los métodos alternativos en uso, el certificado de validación de tercera parte y el método de referencia.

El laboratorio entonces puede seleccionar un procedimiento normalizado, publicado como norma o adquirir un sistema de medición comercial, si bien, en estos casos el procedimiento de validación ya ha sido realizado, estos se deben verificar para confirmar la capacidad del laboratorio de ejecutar el método. Esto implica que debe realizarse algún trabajo experimental para demostrar que el método funciona adecuadamente en el laboratorio<sup>10</sup>.

La ISO 16140-3 reconoce, que, en la actualidad, hay algunos métodos de referencia ISO o CEN que no están totalmente validados, por lo cual, como una medida temporal (hasta 2027-12-31) incluye un protocolo específico (anexo F) para su verificación por parte de los laboratorios, mientras se espera que los comités respectivos de ISO y CEN los validen<sup>55</sup>.

Consulte la ISO 16140-3

[https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/Transition\\_period\\_for\\_the\\_implementation\\_of\\_ISO\\_16140-3\\_version\\_20210119.pdf](https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/Transition_period_for_the_implementation_of_ISO_16140-3_version_20210119.pdf)

## 2.2 REQUISITOS PREVIOS PARA LA EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO MICROBIOLÓGICOS



Antes de iniciar la evaluación de desempeño del método es importante que las prácticas de control de calidad estén diseñadas para garantizar que los procesos del laboratorio están bajo control, es decir, disponer de un protocolo de aseguramiento de la validez de los resultados, que corresponde a un requisito normativo de la ISO/IEC 17025. Todos los laboratorios tienen algunas prácticas de control de calidad intralaboratorio que han evolucionado a partir del sentido común y de los principios de experimentación controlada, para indicar la eficacia del método y el rendimiento del laboratorio.

El sistema de control de calidad de un laboratorio establece las políticas o el programa de control de calidad y las actividades necesarias para minimizar los errores sistemáticos y aleatorios resultantes de las variaciones en el personal, la instrumentación, el equipo, los reactivos, los suministros, los métodos de muestreo y análisis, el manejo de los datos y la presentación de los mismos<sup>57,21</sup>. A continuación, se detallan algunos:

- **Personal:** las pruebas microbiológicas deben ser realizadas por un microbiólogo o un profesional con un nivel adecuado de educación, formación y experiencia en las técnicas microbiológicas generales que se emplean en el laboratorio, lo que se evidencia en las competencias del personal. Dentro de este contexto, la competencia se define como la aplicación de los conocimientos, habilidades o comportamientos que se utilizan al realizar las tareas de un trabajo específico, de manera que éstas puedan ser definidas, autorizadas y monitoreadas en el tiempo. Si no se dispone de dicho personal, un microbiólogo profesional debe proporcionar formación en técnicas específicas y estar disponible para revisar el trabajo.
- **Bioseguridad:** la bioseguridad es una preocupación para todos los laboratorios microbiológicos para prevenir la exposición al riesgo biológico. Un programa de seguridad en el laboratorio abarca un proceso continuo de reconocimiento, evaluación y mitigación de riesgos asociado a acciones que aseguren que el proceso sea sostenible en el tiempo, lo que se conoce como Gestión de Riesgos en el laboratorio, y tiene como objetivo principal el control de éstos. Hay tres elementos a tener en cuenta: las prácticas de laboratorio, el equipo de seguridad y el diseño de las instalaciones. El personal debe estar capacitado en técnicas asépticas y usar equipo de protección personal (EPP) (gafas de seguridad, ropa de protección, guantes, etc.). de un trabajo específico, de manera que éstas puedan ser definidas, autorizadas y monitoreadas en el tiempo. Si no se dispone de dicho personal, un microbiólogo profesional debe proporcionar formación en técnicas específicas y estar disponible para revisar el trabajo.
- **Instalaciones:** el laboratorio debe disponer de un diseño de las áreas que faciliten el flujo de las actividades de manera segura, considerar control de acceso, infraestructura y mobiliario que cumpla con los requerimientos de un laboratorio de ensayo

microbiológico, disponer de una ventilación libre de polvo y que evite temperaturas extremas o fuera del rango establecido por el área analítica. Los servicios y suministros deben abastecer de manera segura la iluminación, alimentación eléctrica de los equipos, y un abastecimiento adecuado de agua. Desarrollar protocolos de control ambiental para garantizar que las condiciones ambientales no invaliden los resultados, perjudiquen la calidad de las mediciones o dañen al personal. Los controles ambientales incluyen limpieza y desinfección, temperatura y humedad y nivel de contaminación biológica con el monitoreo del control del aire del laboratorio y superficie de los mesones.

- **Equipos e instrumentos de laboratorio:** El laboratorio debe procurar identificar los equipos por su número de serie o por un número de referencia único para el laboratorio, verificar (mediante una supervisión constante) el mantenimiento rutinario y preventivo, así como un programa de calibración regular que demuestre que cada elemento satisface las necesidades de precisión, minimización de sesgo y trazabilidad, proporcionar procedimientos escritos sobre el uso, el funcionamiento, la calibración y el mantenimiento de los equipos e instrumentos pertinentes, junto con los criterios de aceptación de control de calidad adecuados, así como asegurar que el laboratorio dispone de todo el equipamiento necesario con los softwares actualizados.
- **Suministros de laboratorio:** adquirir y demostrar que son adecuados para el uso, por medio de registros, certificados de análisis, trazabilidad, pureza o nivel de tolerancia del fabricante (si se suministran) de todos los suministros de laboratorio. Contar con los suministros suficientes para realizar los ensayos.
- **Procedimientos normalizados de trabajo (PNT):** Los PNT genéricos y específicos, constituyen la columna vertebral de un laboratorio analítico y deberían estar diseñados para evitar desviacio-

nes debidas a un proceso o método malinterpretado. Cada PNT específico describe, paso a paso, los detalles de una tarea o procedimiento rutinario adaptado al equipo, la instrumentación y los tipos de muestra propios del laboratorio. Vale la pena aclarar que para tener PNT el laboratorio debe haber hecho una selección del método que va a implementar. También es importante asegurarse de utilizar las versiones vigentes con el contenido actualizado.

El uso coherente de los PNT ayuda a garantizar la uniformidad de las operaciones. Además, son una herramienta de formación eficaz y un medio para determinar la competencia cuando se realiza una evaluación.

Hay al menos cuatro etapas de alistamiento determinantes, previas a la evaluación del desempeño del método de medición en microbiología:

- **Selección del método.**
- **Preparación del inóculo.**
- **La selección de las muestras para los ensayos.**
- **Evaluación de los medios de cultivo o detectores.**

A continuación, se describen las características más importantes de cada una de estas etapas.





## 2.2.1 SELECCIÓN DEL MÉTODO



Frente a un requerimiento o necesidad por parte de un cliente, la primera actividad que debe adelantar el laboratorio es la selección del método de medición más apropiado. En este punto, las alternativas pueden ser: un método cualitativo cuyo objeto es determinar el valor de la propiedad de interés (identidad o detección) o un método cuantitativo para establecer la cantidad o concentración (presuntiva) del microorganismo de interés. En seguida, el laboratorio establece si dispone de métodos normalizados adecuados, no normalizados o si es necesario desarrollar o modificar un método de manera tal que se esté en capacidad de cumplir con los requisitos de uso previsto.

Algunos elementos que pueden orientar al laboratorio en la mejor selección del método, se basan en identificar si el método<sup>26</sup>:

- **Se basa en principios científicos subyacentes sólidos.**
- **Es aplicable para análisis de rutina de muestras.**
- **Presenta alto nivel de reproducibilidad.**
- **Puede detectar analitos en el intervalo de concentración de interés.**
- **Tiene suficiente especificidad y sensibilidad para el uso previsto.**
- **Puede cumplir con los criterios específicos de rendimiento del método.**
- **Se puede realizar con equipo fácilmente disponible.**
- **Se puede realizar a un costo razonable. Efectividad tiempo/costo.**
- **Aborda el nivel de experiencia requerido (por ejemplo, ¿hay áreas sensibles a la técnica? ¿Se requiere capacitación especializada?).**

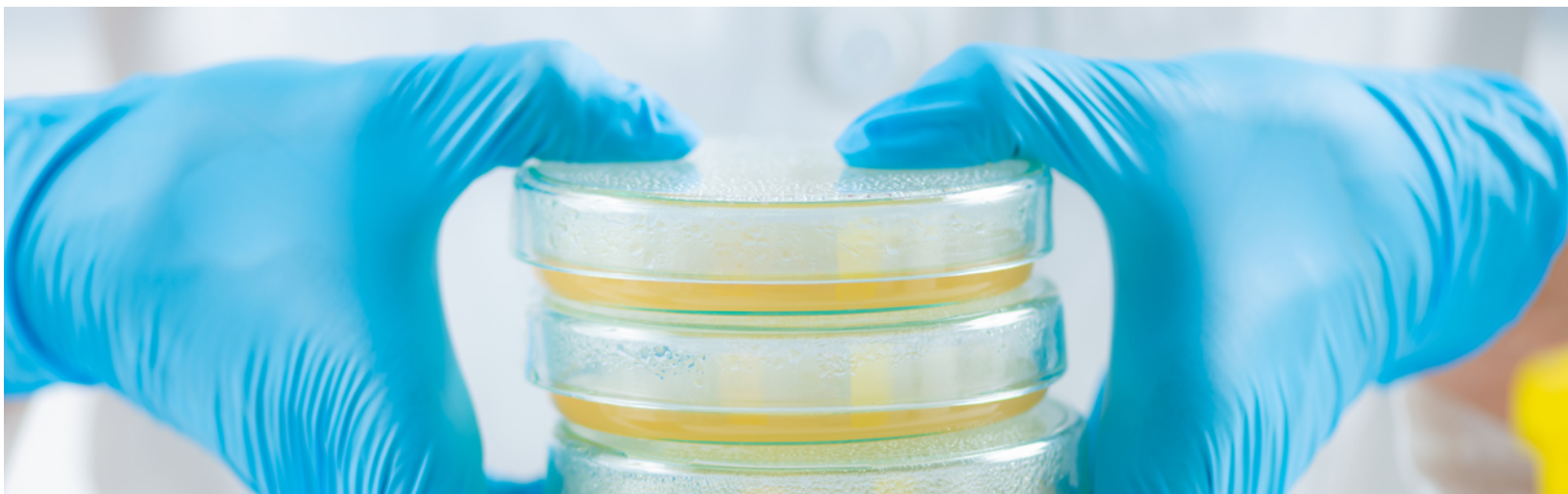
- **Contiene aspectos necesarios de aseguramiento de la calidad (por ejemplo, equipo calibrado, calidad de los medios, condiciones de incubación).**
- **Aborda los problemas de bioseguridad (por ejemplo, ¿Existen prácticas específicas de bioseguridad necesarias para manejar los patógenos de prueba?)**
- **¿El método requiere validación o verificación?**

Es recomendable tomar el tiempo necesario para seleccionar el método más apropiado según el propósito. Por ejemplo, las detecciones de bajas concentraciones deben estudiarse por razones de salud pública y de otro lado, siempre es deseable escoger el método que mejor recuperación tenga. Sin embargo, puede ser mejor escoger uno con baja recuperación pero que no requiera validación <sup>49</sup>.

## 2.3 PREPARACIÓN DEL INÓCULO



La preparación del inóculo, que generalmente es de manera artificial, es una etapa clave durante la validación y/o verificación de un método que se usa para la adición de las muestras y para el cálculo de algunos parámetros de desempeño (como precisión, límite de detección, sesgo, entre otros). Para esto, se pueden usar cepas de colección propia del laboratorio; siempre y cuando estén bien caracterizadas, cepas de colecciones reconocidas y/o materiales de referencia certificados (MRC por sus siglas en inglés) ofrecidos comer-



cialmente. Los MRC cuantitativos (como las cepas de recuento conocido) permiten establecer de manera rápida, segura y confiable el valor de la dilución a preparar, para obtener la concentración de microorganismos (en UFC) esperada, de lo contrario, se requiere que el laboratorio estandarice muy bien la preparación del inóculo bajo las condiciones del ensayo (tipo de microorganismo, matriz, tipo de ensayo) del laboratorio para garantizar que están dentro de unos límites de confianza adecuados y establecer la dilución a preparar para obtener la concentración deseada.

**Nota:** La preparación del inóculo, se realiza mediante diluciones seriadas (sucesivas), las que pueden ser decimales o no, según las indicaciones del protocolo, y en un diluyente apropiado para conseguir el número de organismos deseados (UFC) en un volumen determinado. También es importante indicar, que las suspensiones o inóculos se utilizan dentro de un tiempo definido.

Si la recuperación del analito es una característica de desempeño a evaluar, los niveles de contaminación de la muestra deberán ser adecuados y ajustados en el laboratorio con los inóculos preparados<sup>26</sup>. Es permitido trabajar con muestras artificialmente contaminadas y la concentración adicionada debe estar dentro del intervalo de trabajo seleccionado<sup>11</sup>. Los trabajos con concentraciones altas del microorganismo no son muy útiles, se prefiere trabajar en concentraciones bajas, que, además, para algunos métodos es lo más deseable. En cualquier caso, es importante garantizar que los microorganismos de interés adicionados se encuentren distribuidos de manera homogénea en las muestras de análisis, lo que algunas veces es un desafío en los métodos microbiológicos<sup>7</sup>. La adición de los inóculos a las muestras se hace en condiciones asépticas, preferiblemente dentro de una cabina de seguridad biológica.

Para tener en cuenta, es importante saber que la distribución de los microorganismos no es normal o log-normal, sino que puede seguir una distribución de Poisson, e incluso, debido a la variabilidad natural de los microorganismos, genera una varianza mayor a la esperada (sobredispersión), una distribución binomial negativa<sup>58</sup>.

La preparación de los inóculos se puede llevar a cabo por medio de los siguientes métodos:

- **Turbidimétricos:** se usan principalmente cuando el laboratorio no cuenta con un MR de concentración conocida. A partir del MR se preparan diluciones seriadas y se puede estimar la concentración a partir de lecturas por densidad óptica, en especial por absorbancia. Dentro de estos están:
  - **Patrón de McFarland:** estándar de turbidez para ajustar la densidad de una suspensión bacteriana. La densidad celular se ajusta en comparación simple con el estándar. Esto se puede realizar directamente de manera visual o midiendo con un espectrofotómetro a una longitud de onda especificada por el fabricante.
  - **Densímetros o densitómetros:** permiten calcular valores de McFarland de forma automática de la suspensión del microorganismo.
- **Conteo de células viables:** este método permite determinar la concentración de células que se encuentran vivas. Se realizan diluciones seriadas y una alícuota es sembrada por esparcimiento en superficie o siembra en profundidad sobre una placa de medio de cultivo sólido. Luego de la incubación, se desarrollarán colonias aisladas a partir de cada una de las células viables sembradas y se realiza el conteo para estimar la concentración de acuerdo a la dilución.
- **Cálculo o fórmula:** a partir de una suspensión inicial conocida de microorganismos, se puede preparar una concentración deseada empleando la fórmula:

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

**V1:** volumen inicial

**V2:** volumen final

**C1:** concentración inicial

**C2:** concentración final

EC. 1

**Ejemplo:** Se requiere preparar 50 mL de una suspensión bacteriana con 80 UFC/mL a partir de una suspensión de 150 UFC/mL.

$$V1 = \text{¿?}$$

$$V2 = 50 \text{ mL}$$

$$C1 = 150 \text{ UFC/mL}$$

$$C2 = 80 \text{ UFC/mL}$$

Despejando la fórmula sería:

$$V1 = \frac{(V2 * C2)}{C1}$$

$$V2 = \frac{(50 \text{ mL} * 80 \text{ UFC/mL})}{150 \text{ UFC/mL}}$$

$$V1 = 26,67 \text{ mL}$$

Es decir, que se requiere tomar 26,67 mL de la suspensión inicial y completar hasta 50 mL para obtener una concentración de 80 UFC/mL.

Las diluciones del MR se preparan de acuerdo con el procedimiento de trabajo de cada laboratorio; sin embargo, algunos documentos de consulta para esta etapa son:

- **ISO 16140-2, anexo C:** Presenta un protocolo para contaminación artificial de las muestras<sup>59</sup>.
- **ISO 11133:** Preparación, producción, conservación y ensayo de rendimiento de los medios de cultivo, numeral 5.4.2.3<sup>31</sup>.

La tabla 4 presenta un resumen de los niveles de los inóculos requeridos en ejercicios de validación o verificación, de acuerdo con la serie ISO 16140 así como en AOAC, los cuales pueden servir como guía en los procedimientos a implementar en los laboratorios.

**Tabla 4:** Niveles de contaminación para evaluación de desempeño de los métodos microbiológicos de alimentos.

Preparación del inóculo		
Referencia	Métodos cualitativos	Métodos cuantitativos
ISO 16140-2	<p>Para el estudio de sensibilidad se prepara un inóculo en nivel de recuperación fraccional, (idealmente 50% positivos y 50% negativos).</p> <p>Para cálculo del Límite de detección relativa, LODr, se preparan al menos tres niveles de contaminación: el primer nivel es negativo, el segundo es el nivel de detección teórico y el tercero está justo encima del nivel de detección teórico. El segundo nivel debería tener, al menos, una recuperación fraccional del método de referencia (la recuperación fraccional en el nivel inferior debería ser entre el 25% y el 75% del número de muestras analizadas).</p> <p>Para inclusividad, el nivel del inóculo se espera que este de 10 a 100 veces mayor que el nivel de detección mínimo del método alternativo que se está validando y el protocolo del método alternativo debe usarse incluyendo todos (enriquecimientos) los detalles en las instrucciones del método alternativo.</p> <p>Para exclusividad la inoculación de un medio de crecimiento apropiado se realiza con una dilución de un cultivo puro en cada cepa de prueba. El cultivo puro debería crecer en un caldo no selectivo bajo condiciones óptimas de crecimiento para proporcionar poblaciones celulares altas en una etapa estacionaria.</p>	<p>Para el estudio de veracidad relativa y para el estudio perfil de exactitud, las muestras se contaminan a un nivel que sea representativo de la variación natural del nivel de contaminación.</p> <p>Para el estudio de precisión y el de límite de cuantificación se requiere contar con muestras contaminadas en nivel alto, medio y bajo.</p>
ISO 16140-3	<p>De acuerdo con el diseño experimental seleccionado, se dispone de cuatro niveles: alto (9 veces el límite de detección esperado), intermedio (3 veces el límite de detección) y bajo (1 vez el límite de detección) y, el cuarto nivel entre 3 y 5 UFC; este se usa cuando se conoce la concentración inicial del inóculo con el que se va a trabajar (es decir cuando se trabaja con MRC). Ver tabla 4 en ISO 16140-3.</p>	<p>El nivel de contaminación se espera que este dentro del intervalo de contaminación natural del alimento. Se presenta un ejemplo de preparación a partir de cepas no cuantificadas y también incluye la opción de usar material de referencia cuantitativo. ( ver 6.1.5.2 de ISO 16140-3)</p>



Preparación del inóculo		
Referencia	Métodos cualitativos	Métodos cuantitativos
ISO 16140-4	Preparar tres niveles de contaminación, uno cero (blanco), uno bajo (L1) con recuperación fraccional y uno alto con 100% positivos para calcular sensibilidad y límite de detección relativo.	Se requiere contar con muestras contaminadas en nivel alto, medio y bajo para el estudio de precisión y el de límite de cuantificación.
AOAC, apéndice J	Al igual que ISO 16140-4, considera tres niveles de contaminación: un blanco o nivel cero, un nivel fraccional que genere entre un 25% y 75% de positivos, y un tercer nivel con una contaminación que asegure 100 % de positivos.	

Fuente: Elaboración propia

## 2.4 SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS



El material óptimo de ensayo lo constituyen muestras contaminadas naturalmente, sin embargo, en la práctica no siempre es posible. En algunos casos, es posible tener muestras con microorganismos acompañantes en bajas o medianas concentraciones, las cuales se pueden usar y se recomienda mantener la carga microbiana natural de la muestra. Pero, teniendo en cuenta que se pueden presentar inhibiciones propias de la matriz, ausencia del microorganismo de interés, estrés microbiano o lesión de los microorganismos, se hace necesario realizar una contaminación artificial o fortificación con el microorganismo objetivo<sup>7</sup>.

La etapa de preparación de las muestras para la ejecución de los estudios es sumamente importante, la cual varía dependiendo del método y tipo de muestras a analizar. La variedad y el número de muestras seleccionadas debe ser apropiado; al respecto, el Anexo A de ISO 16140-2 incluye una tabla de clasificación de muestras de alimentos por tipos, además de sugerir algunos microorganismos que se puedan considerar para la preparación de las mismas. La selección de los alimentos incluidos en el estudio debe garantizar aquellos con microbiota propia (natural) alta y baja, diferentes tipos de estrés debido al procesamiento, así como, elementos crudos (sin procesar)<sup>59</sup>.

Para el caso de los protocolos de ISO 16140, cada parte detalla cómo se hace la selección de muestras, y en el caso de AOAC, ésta reconoce las categorías de alimentos y las matrices validadas con éxito en el estudio del desarrollador del método o en el estudio colaborativo, donde el número de matrices requeridas depende de la aplicabilidad del método y las cuales deben estar incluidas en el estudio de validación. En la tabla 5, se recogen algunas indicaciones puntuales de los protocolos de ISO.

**Tabla 5:** Selección de muestras para adelantar la evaluación de desempeño de los métodos microbiológicos.

Selección de muestras		
Referencia	Métodos cualitativos	Métodos cuantitativos
	Si el alcance va a ser para amplia gama de alimentos, entonces al menos cinco categorías de alimentos deben ser evaluadas. Si el método va a ser para un restringido número de categorías, solo se evalúan esas categorías.	
ISO 16140-2	Para cada categoría, al menos 60 muestras individuales de alimentos deben ser probadas. (Ver 5.1.3.2. de ISO 16140-2)	Para cada categoría, mínimo 15 muestras en al menos tres tipos de alimentos por categoría (ver 6.1.2.2. de ISO 16140-2)
ISO 16140-3	<i>Verificación de implementación:</i> Escoger un tipo de alimento (necesario incluir un tipo de alimento que haya sido evaluado durante la validación) que esté dentro del alcance del método validado.	<i>Verificación de implementación:</i> Escoger un tipo de alimento (no necesariamente evaluado dentro del estudio de validación) que esté dentro de la categoría de los alimentos incluidos en el estudio de validación.
	<b>Nota:</b> En los tipos de métodos para la <i>verificación de alimento</i> , si el alcance es “amplia gama de alimentos” se deben incluir al menos 5 categorías o, según el alcance de la aplicación del método en el laboratorio, verificar el número de categorías a incluir en la verificación. Los alimentos escogidos deben estar dentro del alcance de la validación del método.	
AOAC, apéndice J	AOAC reconoce las muestras incluidas y validadas exitosamente en el Estudio de validación del desarrollador del método (PTM) o el estudio colaborativo (CS) o el estudio pre- colaborativo (PCS) también denominado validación en un solo laboratorio. Las superficies ambientales se pueden incluir y el director del estudio puede seleccionarlas, todas las superficies declaradas deben estar en el PCS y en PTM. Ver 4.1.3.3. para algunas superficies.	

Fuente: Elaboración propia

Otra forma de seleccionar las muestras es teniendo en consideración la información sobre las matrices o muestras más frecuentemente procesadas en el laboratorio para el microorganismo en cuestión, y aquellas, que por su naturaleza y composición presentan carga bacteriana para el aislamiento. Asimismo, se pueden considerar alimentos que hayan sido reportados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) o en retiros del mercado, la información de estos eventos puede ser consultada en fuentes oficiales del Ministerio de Salud y Protección social (SIVIGILA, Boletines epidemiológicos del Instituto Nacional de Salud, INVIMA).



## 2.5 EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO



Los medios de cultivo, también denominados detectores en microbiología, se pueden encontrar en presentación líquido, sólido o semisólido y pueden ser usados para enumeración, detección o identificación. El control de calidad y de desempeño de los medios es una actividad previa al análisis de las muestras, bien sea durante la rutina analítica o para la validación/verificación.

Para algunos métodos se usan conjuntos de detectores, como es el caso de NMP en series de 3 o 5 tubos o las placas de microtubos o microplacas, en las cuales, puede ser un pozo o toda la placa considerada como el conjunto detector. Todas las formas de validación en microbiología se centran en el desempeño de los detectores<sup>49</sup>.

La calidad de los medios depende de la calidad de las materias primas usadas, así como de la preparación según las instrucciones de los fabricantes y el adecuado almacenamiento y manipulación de estos<sup>31</sup>. La evaluación de calidad de los medios se puede hacer siguiendo los criterios de desempeño establecidos en la norma ISO 11133 o siguiendo las indicaciones de las farmacopeas, donde se pueden consultar las instrucciones para hacer las pruebas de desempeño de los medios de cultivo (ver capítulo 61)<sup>60</sup>.

De acuerdo con ISO 11133, las características mínimas de calidad que debe proporcionar un medio de cultivo son: **i)** la aceptabilidad de cada lote de medio preparado, **ii)** la aptitud para el propósito y **iii)** la consistencia en los resultados que el medio puede producir; las cuales, en conjunto con los procedimientos de validación, le permitirán al laboratorio garantizar la calidad de los resultados proporcionados.





# Capítulo 3



VALIDACIÓN

Las normas de calidad para el desempeño de los laboratorios de ensayo establecen los requisitos para los laboratorios, que incluyen no solamente elementos del sistema de calidad, sino también demostración objetiva de la idoneidad técnica del laboratorio y de la calidad de los resultados informados, en algunos casos establecen<sup>60</sup> los requisitos relativos a los métodos de ensayo utilizados. Estos requisitos solamente pueden ser alcanzados a través del desarrollo y la validación de los métodos por medio de estudios colaborativos en centros y laboratorios de reconocido prestigio.

Las organizaciones como AOAC, ISO, FIL-IDF, AFNOR, NMKL coordinan el desarrollo de métodos de referencia, la validación y proceden luego a la publicación de los mismos. En el desarrollo y validación del método se establecen claramente: el alcance (producto, matriz), la selectividad y especificidad, los rangos de aplicación y la incertidumbre estimada en el resultado (repetibilidad, reproducibilidad, exactitud). Todos estos parámetros de desempeño se establecen mediante los estudios colaborativos, que son ejercicios que caracterizan el desempeño del método y su aptitud para el uso propuesto.

La validación exitosa de cualquier método analítico no es posible sin una planificación y preparación exhaustiva y sistemática. Se debe preparar un plan de validación escrito para cada etapa del proceso que incluya un diseño experimental y someterlo a una revisión adecuada antes de la implementación. Por otro lado, se espera que el laboratorio cuente con un sistema o un programa de aseguramiento de la calidad para garantizar la estandarización y armonización de cada una de las operaciones del laboratorio<sup>26</sup>. Ver numeral 2.2 selección del método.



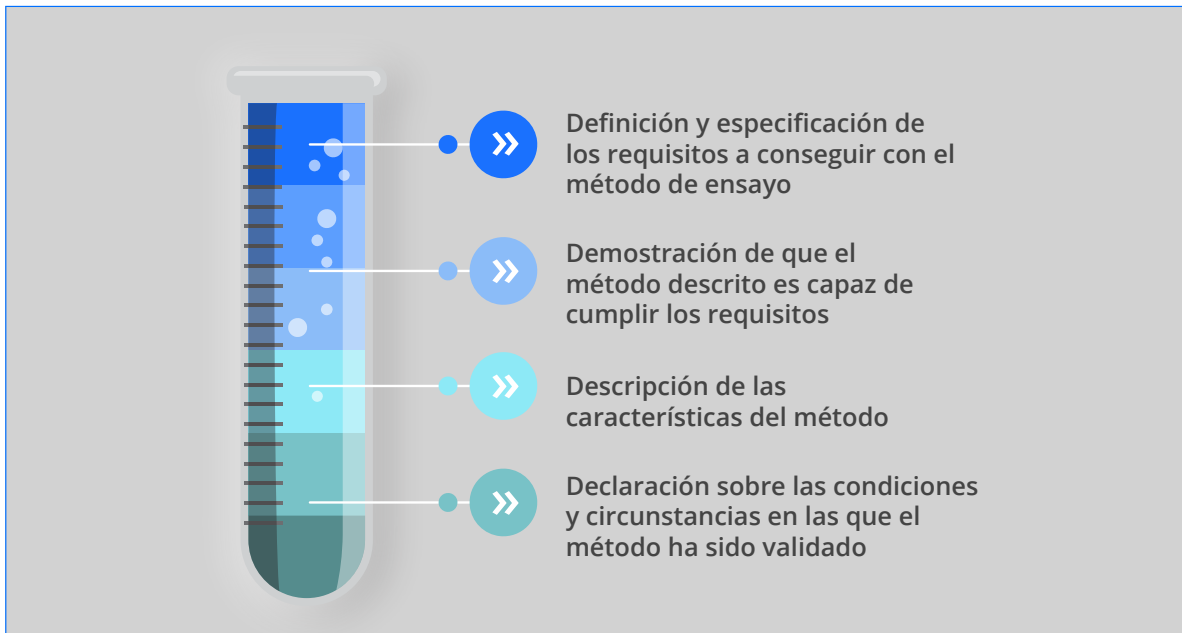
Como se ha mencionado previamente, el procedimiento a seguir en relación con las actividades de validación/verificación de un método, dependerá de la necesidad del cliente, a partir de la cual se establece el fin previsto del método y, por lo tanto, los requisitos analíticos que éste debe cumplir, por ejemplo: el tipo de método (cuantitativo o cualitativo), su selección (normalizado, no normalizado o desarrollados por el laboratorio), así como el contar con personal técnico calificado y entrenado, las instalaciones y el equipamiento adecuado.

La norma ISO/IEC 17025:2017, indica que el laboratorio debe conservar como evidencia los siguientes registros del proceso de validación/verificación de método:

- a) El procedimiento de validación utilizado**
- b) Las especificaciones de los requisitos**
- c) La determinación de las características de desempeño del método**
- d) Los resultados obtenidos**
- e) Una declaración de la validez del método, detallando su aptitud para el uso previsto**

En resumen, las etapas principales pueden resumirse de la siguiente manera (ver figura 1):

■ **Figura 1:** Proceso de validación/verificación de un método.



**Fuente:** Curso Norma ISO/IEC 17025:2017 , ISP 2021

En aquellos casos en los que el laboratorio requiere desarrollar o modificar un método que dé respuesta a la necesidad del cliente en cuanto a su capacidad de detección, identificación y/o cuantificación, el laboratorio debería evaluar una o varias características de desempeño del método. Por eso, es conveniente validar y demostrar la capacidad de éste para cumplir con el requisito. Si el requisito no se cumple, significa que el método necesita un mayor grado de desarrollo<sup>10</sup>.

En este sentido, la validación debe cubrir<sup>61</sup>:

- **Todo el proceso analítico**
- **Todo el intervalo de aplicación del método, entendido como el intervalo de concentración de microorganismos que rutinariamente se somete a medición mediante el método** (alto, medio y bajo).
- **Las matrices de interés sobre las cuales se va a aplicar el método.**

Así, de acuerdo con el uso previsto definido para el método, lo que se pretende a través del estudio de validación es demostrar que el método puede detectar, identificar y/o cuantificar un analito o grupos de analitos<sup>8</sup>:

- **En una o más matrices a ser analizadas** (ejemplo: derivados lácteos, frutas y productos frescos, derivados cárnicos, etc.)
- **En uno o más instrumentos o plataformas de medición** (ejemplo: ensayos de detección tradicionales, plataformas de PCR, microscopía, etc.)
- **Con una sensibilidad, especificidad, exactitud, precisión, reproducibilidad, veracidad y robustez demostradas que permita asegurar que los resultados son útiles y apropiados para tomar una decisión.**
- **Confiable para el uso previsto**, (como pueden ser: de emergencia o contingencia, screening rápido, pruebas de alto rendimiento o para análisis confirmatorios.)
- **Una vez determinadas o verificadas las características de desempeño, éstas son útiles para definir o cuantificar el desempeño del método.**

Aunque hay varias referencias técnicas reconocidas para estudios de validación de métodos, dos de las más conocidas en microbiología de alimentos son, la guía AOAC Apéndice J: Directrices del Comité de Métodos de la AOAC INTERNACIONAL para la validación de métodos microbiológicos para alimentos y superficies alimentarias y ambientales y los protocolos de la familia ISO 16140 específicos para la validación y verificación de métodos de ensayo microbiológicos de alimentos (ISO 16140 parte 2,3,4,5,6).

Vale la pena aclarar que, los protocolos citados (guía AOAC Apéndice J y las partes 2 y 6 de ISO 16140) definen lineamientos dirigidos a los desarrolladores o proveedores de métodos alternativos de casas comerciales que estén interesados en demostrar la equivalencia y

desempeño de éstos frente a los métodos de referencia. En este sentido, los protocolos de validación establecen los requisitos en términos de tipo y número de muestras, matrices, niveles de contaminación, número y tipo de microorganismos, desarrollo de estudios interlaboratorio, etc., requisitos que no siempre se ajustan al alcance de aquellos laboratorios que prestan servicios de ensayo a diferentes clientes. Sin embargo, si un laboratorio desea desarrollar un método propio o adecuarlo para otro alcance diferente del fin previsto establecido inicialmente, debe validar el método teniendo en cuenta los lineamientos definidos en la parte 4 de la ISO 16140 o la validación en un solo laboratorio (SLV) de la Guía AOAC apéndice J.

A continuación, se van a describir brevemente las alternativas para la validación de los métodos microbiológicos, con dos de las referencias más tradicionales en microbiología de alimentos.

### **Guía AOAC Apéndice J: Directrices del Comité de Métodos de la AOAC INTERNACIONAL para la validación de métodos microbiológicos para alimentos y superficies alimentarias y ambientales**

La guía para validación de AOAC (apéndice J), aplica para cualquier método (diseñado por un proveedor o casa comercial o no), que va a ser sometido a evaluación por AOAC, con el objeto de que sea publicado como un método de análisis oficial o certificado como un método alternativo bajo el programa de evaluación del desempeño de métodos (PTM Program) <sup>1</sup>.

Los requisitos de AOAC, también han sido armonizados por la agencia de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés), que dispone de una guía particular para la validación de métodos analíticos usados en la detección de patógenos microbiológicos en alimentos y piensos <sup>8</sup> el alcance aplica para los laboratorios de la FDA (tanto de investigación como los de la Oficina de Asuntos Regulatorios) que desarrollan y validan métodos con fines regulatorios (un alcance diferente al de AOAC).

En la AOAC, se definen tres diferentes niveles de validación de acuerdo con el alcance:

- **Validación en un solo laboratorio (SLV por sus siglas en inglés o estudio pre colaborativo):** Se realiza en el laboratorio donde se origina el método, su objetivo es evaluar algunos parámetros de desempeño incluyendo: inclusividad, exclusividad y probabilidad de detección. Esta etapa permite definir la aplicabilidad del método y constituye la fase previa a un estudio colaborativo, en el camino hacia el reconocimiento como un método de análisis oficial para AOAC o como el primer paso en el proceso de validación para un método para aplicaciones regulatorias de rutina para FDA.
- **Validación en un laboratorio independiente (ILV por sus siglas en inglés):** el propósito de esta validación es evaluar o corroborar si el método puede ser ejecutado exitosamente en un laboratorio diferente al laboratorio de origen del método.

AOAC permite verificar la probabilidad de detección del método por un tercero y constituye un requisito para la aprobación como un método de análisis oficial o para la certificación como un método alternativo; mientras que FDA especifica que esta modalidad de validación puede ser usada para la modificación o extensión de un método que no requiere una validación intra-laboratorio, específicamente en los siguientes casos:

- **Métodos nuevos o modificados que no han sido completamente validados a través de un estudio interlaboratorio.**
- **Métodos validados completamente a través de un estudio interlaboratorio en donde se ha hecho algún cambio en la preparación de la muestra para una o varias matrices.**

- **Estudio colaborativo o validación multi-laboratorio (CS o MLV por sus siglas en inglés):** Es un estudio interlaboratorio donde múltiples laboratorios usan un método de análisis definido para analizar porciones idénticas de un material homogéneo con el objeto de evaluar características de desempeño del método, la más común, la reproducibilidad. Para AOAC constituye un requisito para los métodos de análisis oficial; para FDA este estudio incluye criterios de inclusividad/exclusividad, niveles de contaminación del analito, cepas competidoras y comparación del método con un método reconocido de referencia, si este existe.

Dado el alcance sobre la aplicación de los métodos validados, en relación con las actividades de vigilancia y regulación, FDA hace una aclaración sobre el fin previsto que se puede dar a los métodos según el tipo de estudio de validación al que es sometido el método de análisis<sup>8</sup>:

*“La validación en un solo laboratorio y la validación por un laboratorio independiente, aplican solo para situaciones de emergencia, mientras que la validación multi-laboratorio (estudios interlaboratorio) se acepta para todos los fines regulatorios. Por ejemplo: análisis de confirmación, estudios de brotes, análisis de rutina para vigilancia y control”.*





## Serie Normas ISO 16140

Existen hoy en día, muchas alternativas (en su mayoría patentadas) de métodos que se utilizan para evaluar la calidad microbiológica de las materias primas y productos alimenticios terminados y supervisar el estado microbiológico de los procesos de fabricación. Los desarrolladores, usuarios finales y autoridades necesitan un protocolo común fiable para la validación de estos métodos alternativos y la verificación de los métodos previamente validados.

La ISO cuenta con la serie de normas 16140 para microbiología de alimentos, la cual contiene un conjunto de protocolos técnicos para la validación de métodos, tanto cualitativos como cuantitativos, entre los que se incluye la comparación con métodos de referencia, estudios interlaboratorios y recientemente directrices para la verificación y validación de métodos en un solo laboratorio. Incluye además recomendaciones específicas para el diseño de los estudios, cálculos y análisis de datos.

La serie está constituida por 6 partes:

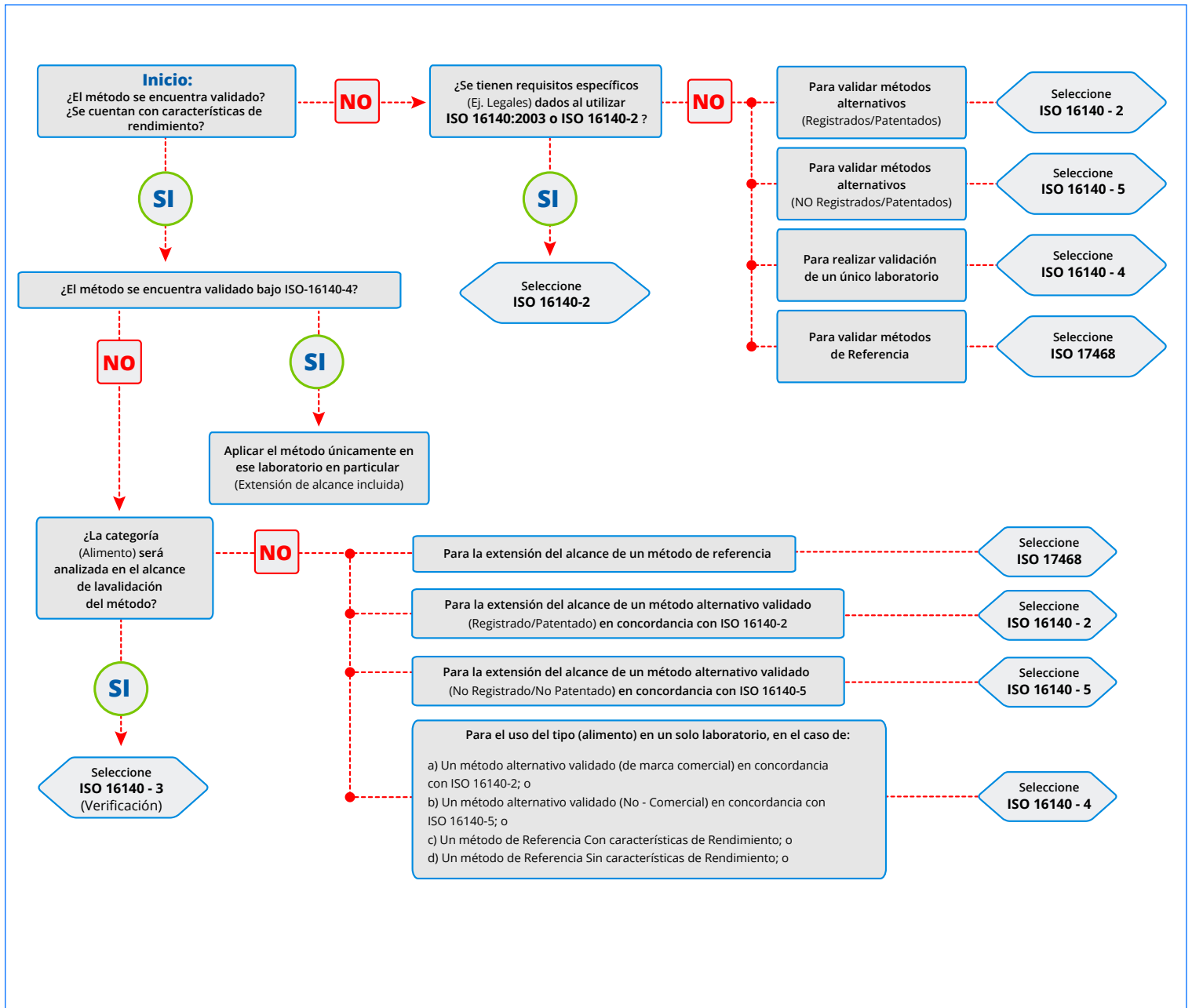
- **Parte 1 (2016): Vocabulario**
- **Parte 2 (2016): Protocolo para la validación de un método alternativo (de marca comercial) frente a uno de referencia.**
- **Parte 3 (2021): Protocolo para la verificación de un método de referencia y un método alternativo validado en un solo laboratorio (aplica al Laboratorio de ensayo)**
- **Parte 4 (2020): Protocolo para la validación de un método en un solo laboratorio. En este caso los resultados sólo son válidos para el laboratorio que realizó el estudio y la verificación no es aplicable (aplica al Laboratorio de ensayo)**

- **Parte 5 (2020): Protocolo para la validación factorial inter-laboratorio de métodos alternativos que no están registrados o patentados** (denominados en inglés “non-proprietary”). **En esta parte de la ISO, se requiere una validación más rápida o cuando el método a validar es altamente especializado y no se puede alcanzar el número de laboratorios participantes requerido por ISO 16140-2** (aplica al Laboratorio de ensayo).
- **Parte 6 (2019): Protocolo para la validación de un método alternativo (de marca comercial) para la confirmación microbiológica y los procedimientos de tipificación.**

Cabe señalar, que en la serie ISO 16140, los métodos de referencia incluyen métodos de referencia estandarizados (ISO y CEN) como se define en ISO 17468:2016, es decir, categorizado como un método de referencia descrito en una norma. Por otra parte, un método alternativo (método que puede estar registrado o patentado) se define en ISO 16140-1:2016, como un método de análisis que detecta o cuantifica, para una categoría dada de productos, el mismo analito que se detecta o cuantifica usando el correspondiente método de referencia.

Con el desarrollo de las nuevas versiones de la serie 16140, la organización tuvo en cuenta que no todos los métodos ISO para análisis microbiológico están completamente validados, así como la necesidad que puede tener un solo laboratorio para validar un método (*in-house*) y no se tiene acceso a un estudio interlaboratorio. La figura 2 es un diagrama que orienta el uso de la serie de normas 16140 donde especifica en qué parte se debe consultar según el propósito del estudio que se va a adelantar, además presenta la relación existente entre las diferentes partes de la norma:

**Figura 2:** ISO 16140. Diagrama para la selección del protocolo de evaluación del desempeño a realizar.



Traducción de figura de ISO 16140 por INM, 2022

Para un laboratorio de ensayo, una vez definida la necesidad del cliente y establecidos los requisitos del método, es el momento de identificar los métodos disponibles y en primera instancia, seleccionar el o los métodos normalizados de referencia (de acuerdo con ISO 17468) para implementar en sus instalaciones.

La norma internacional ISO 17468, ofrece requisitos técnicos y directrices para el establecimiento o la revisión de métodos de referencia normalizados para el análisis (detección o cuantificación) de microorganismos en:

- **Productos destinados al consumo humano o la alimentación animal**
- **Muestras ambientales recogidas del área de producción y manipulación de los alimentos destinados al consumo humano o animal**
- **Muestras procedentes de la etapa de producción primaria**

Esta norma internacional define la fase técnica (fase inicial) del proceso de establecimiento de un método de referencia normalizado nuevo o de la revisión de un método de referencia normalizado existente. Incluye, de manera particular, los requisitos y las directrices para la validación del método seleccionado.

Antes de usar un método en el laboratorio, es necesario demostrar que se puede alcanzar el desempeño requerido <sup>19</sup>, por lo cual, los métodos deben ser previamente verificados (ISO 16140-3) o validados (Ver figura 1). En el escenario de la validación, el laboratorio puede orientar sus esfuerzos hacia la validación en un solo laboratorio (ISO 16140-4), debido a que las otras partes de la norma para este tipo de estudio son exigentes en cuanto al número de muestras y recursos necesarios, además, van más dirigidas a organizaciones dedicadas a desarrollar métodos alternativos con fines comerciales.



### 3.1 PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO PARA VALIDACIÓN



Los parámetros de desempeño a evaluar en una validación, corresponden a características cuantificables del método, que indican su nivel de calidad y cumplimiento respecto de los requisitos analíticos establecidos, y a partir de los cuales, se establecen los criterios de desempeño frente a los que se declarará el método como adecuado o no para el propósito (detección, cuantificación o identificación) en relación con un método de referencia. La figura 3 resume algunos de los parámetros de desempeño más importantes en relación con el tipo de método, y la tabla 6 presenta la definición de cada parámetro.

■ **Figura 3:** ISO 16140. Diagrama para la selección del protocolo de evaluación del desempeño a realizar.



Fuente propia: INM, 2021.

**Tabla 6:** Definición de los parámetros de desempeño para validación de un método de ensayo microbiológico.

Parámetro	Definición
<b>Exclusividad</b>	Estudio que involucra cepas puras no objetivo, que pueden tener una reacción cruzada potencial, pero no se espera que sean detectadas o enumeradas por el método alternativo <sup>2</sup> . Al menos 30 cultivos puros de microorganismos no blanco deben ser probados <sup>59</sup> .
<b>Especificidad</b>	<p>La capacidad del método para distinguir el microorganismo objetivo (microorganismo diana) de uno no objetivo, o similar pero genéticamente distinto. Es la falta de interferencia en el método alternativo de un rango relevante de cepas no objetivo, que son potencialmente reactivas<sup>8</sup>.</p> <p>Capacidad del método de establecer los verdaderos negativos, se calcula como la razón entre los verdaderos negativos y la suma de los verdaderos negativos y las muestras clasificadas como falsos positivos <math>E = VN / (VN + FP)</math><sup>14</sup></p>
<b>Inclusividad</b>	Estudio que involucra microorganismos objetivo (microorganismos diana) puras para ser detectadas o enumeradas por el método alternativo <sup>2</sup> . Al menos 50 cultivos puros del microorganismo objetivo (100 cultivos para el caso de métodos de <i>Salmonella</i> ) deben ser probados <sup>59</sup> .
<b>Sensibilidad</b>	<p>La capacidad del método para detectar una amplia gama de microorganismos objetivo (microorganismo diana) mediante una relación definida, ejemplo: composición taxonómica, inmunológica, genética<sup>8</sup>.</p> <p>Proporción de organismos objetivo/diana que el método puede detectar en una población conocida. <math>S = VP / (VP + FN)</math><sup>14</sup></p>
<b>Límite de detección (LOD)</b>	<p>Mínima cantidad de organismos cultivables que pueden ser detectados de manera confiable en la muestra mediante un procedimiento de medición definido, con una probabilidad de detección determinada, ejemplo: Para el caso de métodos cualitativos, se define como el menor número de organismos cultivables que son detectados el 50% de las ocasiones por el método de referencia y el método alternativo<sup>14</sup>.</p> <p>Un límite de detección es la cantidad más baja de analito en una muestra que se puede detectar, pero no necesariamente cuantificar, como un valor exacto. A menudo se denomina límite de detección (LOD), que es el nivel de concentración más bajo que se puede determinar como estadísticamente diferente de un blanco en un nivel de confianza específico. Se determina a partir del análisis de muestras en blanco y muestras a niveles cercanos al LOD esperado<sup>8</sup>.</p> <p>En microbiología la determinación se basa en replicados de análisis con tres niveles diferentes de inoculación del analito objetivo en una matriz analizada o matriz blanco. Aplica para métodos cualitativos en microbiología<sup>2</sup>.</p>



Parámetro	Definición
<b>Nivel de detección</b>	(Métodos cualitativos) Mínima concentración de organismos que produce evidencia de crecimiento en un medio líquido con una probabilidad $p=0.95$ cuando es inoculado en un medio de cultivo definido e incubado bajo condiciones determinadas <sup>2</sup> .
<b>Límite de detección relativo (RLOD)</b>	Relación entre el límite de detección del método de referencia y el método alternativo <sup>59</sup> .
<b>Límite de detección 50 (LOD<sub>50</sub>)</b>	Concentración del analito con una probabilidad de detección (POD) del 50% <sup>1</sup> (AOAC apéndice J 3.13).  El término “nivel de detección” se utiliza para métodos cualitativos en microbiología basados en análisis repetidos con tres niveles de inoculación diferentes del analito objetivo en una matriz analizada. Se analizan las réplicas y se registra el número de resultados positivos (por ejemplo, 20 %, 70 % y 100 %) respectivamente en cada nivel de inoculación. Luego, estos datos se utilizan para determinar el número de células que darían un 50 % positivo utilizando un modelo lineal generalizado (ver ISO 16140-2).
<b>Límite de cuantificación (LOQ)</b>	Límite de determinación: Menor concentración de analito que puede ser cuantificado con un nivel adecuado de precisión y veracidad bajo las condiciones del ensayo <sup>2</sup> .  Cantidad o concentración más baja de analito que puede ser determinado cuantitativamente con un nivel aceptable de incertidumbre, también denominado límite de determinación <sup>8</sup> .
<b>Linealidad</b>	Métodos cuantitativos: Evaluado en una matriz particular, corresponde a la habilidad del método de producir resultados proporcionales a la concentración de analito presente en la muestra. Un incremento en la cantidad de analito, corresponde a un incremento proporcional en el resultado <sup>14</sup> .  Capacidad del método para obtener resultados proporcionales a la concentración <sup>8</sup> .
<b>Precisión</b>	Grado de acuerdo entre resultados independientes bajo determinadas condiciones <sup>1</sup> .  Grado de concordancia de las medidas bajo condiciones especificadas. La precisión se describe mediante métodos estadísticos como una desviación estándar o un límite de confianza. La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación durante un corto período de tiempo. La precisión intermedia expresa variaciones dentro del laboratorio, como diferentes días, diferentes analistas y diferentes equipos. La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios <sup>8</sup> .

Parámetro	Definición
<b>Probabilidad de detección (POD)</b>	Método cualitativo: Proporción de resultados positivos para una matriz determinada, para un determinado nivel o concentración del analito.
<b>Robustez</b>	<p>Sensibilidad del método a pequeños cambios en las condiciones ambientales o factores metodológicos durante la ejecución (tiempo, temperatura de incubación, origen de los ingredientes, pureza, entre otros)<sup>14</sup>.</p> <p>La capacidad de un método para resistir cambios en los resultados del ensayo cuando se somete a desviaciones menores en las condiciones experimentales del procedimiento. Las pruebas de robustez examinan el comportamiento de un proceso analítico cuando se realizan pequeños cambios sutiles en el entorno y/o las condiciones operativas, similares a los que probablemente surjan en diferentes entornos del ensayo<sup>8</sup>.</p>
<b>Veracidad (sesgo)</b>	<p>Grado de concordancia entre el valor verdadero o valor de referencia aceptado y el promedio de un conjunto de resultados obtenido cuando el método de ensayo es aplicado un número amplio de veces.</p> <p>Se puede obtener a partir de materiales de referencia certificados o, en su ausencia, materiales de referencia fortificados<sup>14</sup>. También por fortificación o contaminación artificial de las muestras y se puede expresar como la recuperación analítica.</p>
<b>Veracidad relativa</b>	Razón entre los resultados verdaderos (positivos + negativos) sobre el total de resultados <sup>2</sup> .
<b>Falso positivo (FP)</b>	Cuando el método alternativo da un resultado positivo sin confirmación y el método de referencia da un resultado negativo. El resultado verdadero es negativo <sup>11</sup> .
<b>Falso negativo (FN)</b>	Cuando el método alternativo da un resultado negativo sin confirmación y el método de referencia da un resultado positivo. El resultado verdadero es positivo <sup>11</sup> .
<b>Recuperación fraccional</b>	Muestras replicadas del método alternativo o de referencia que producen 50% (rango 25% - 75%) de respuestas positivas <sup>2</sup> .

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.1.1 PROTOCOLO PARA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO EN UN SOLO LABORATORIO



La validación en un solo laboratorio constituye la primera etapa en el esquema de validación de un método de ensayo, previo al desarrollo de un estudio interlaboratorio, cuando así procede. Por tanto, la validación en un solo laboratorio o *in-house* solo permite evaluar el desempeño del método en ese laboratorio particular, en este sentido, los resultados de medición sólo serán válidos en ese laboratorio.

Un estudio de validación entre laboratorios, de acuerdo con la norma ISO 16140-2, requiere al menos ocho laboratorios para métodos cuantitativos y al menos diez laboratorios para métodos cualitativos. La ISO 16140-5 está destinada para ser utilizada para estudios entre laboratorios que comprendan de cuatro a siete laboratorios para métodos cuantitativos y de cuatro a nueve laboratorios para métodos cualitativos. La ISO 16140-5 solo se puede utilizar para métodos no registrados o patentados.

**Tabla 7:** Descripción general de los diferentes protocolos de validación descritos en la serie ISO 16140<sup>62</sup>

Número de laboratorios participantes	Con método de referencia	Sin método de referencia
1	ISO 16140-4: - Factorial - Convencional	ISO 16140-4: - Factorial - Convencional
4 a 7 (método cuantitativo)/ 4 a 9 (método cualitativo)	ISO 16140-5: - Sólo para métodos no registrados o patentados	ISO 16140-5: - Sólo para métodos cuantitativos no registrados o patentados

Número de laboratorios participantes	Con método de referencia	Sin método de referencia
<p>≥ 8 (método cuantitativo)</p> <p>≥ 10 (método cualitativo)</p>	<p>ISO 16140-2:</p> <p>- Para la parte de estudio interlaboratorio</p>	<p>No aplica</p>

Fuente: ISO 16140-4

Uno de los elementos novedosos en la familia de las normas ISO 16140, es la publicación de la parte 4, la cual define los lineamientos para la validación de un método de ensayo (tanto cualitativos como cuantitativos) en un solo laboratorio; es aplicable para la ampliación del alcance de un método validado con ISO 16140-2, o modificaciones de los métodos existentes. El procedimiento depende de si dicha validación se hace frente a un método de referencia o no.

En cada caso, ISO contempla dos aproximaciones para la ejecución de la validación del método de ensayo:

- **Una aproximación factorial, que permite la evaluación simultánea de un conjunto de factores en determinados niveles de manera que refleje las condiciones de variación normal en un laboratorio durante los ensayos de rutina, por lo que requiere un menor esfuerzo en términos de la cantidad de muestras y ensayos a realizar.**
- **Una aproximación convencional, donde la evaluación de los parámetros de interés se hace una a la vez, por lo que requiere contar con un mayor número de muestras y de ensayos.**

### 3.1.1.1 ESTUDIO DE VALIDACIÓN EN UN SOLO LABORATORIO

#### »»

Se requiere la validación en un solo laboratorio si la validación entre laboratorios (interlaboratorio), de acuerdo con ISO 16140-2, no es apropiada. Las posibles aplicaciones de la validación en un solo laboratorio son:

- **Validación de un método interno o *in-house***
- **Estudio de evaluación de métodos en el proceso de validación de un método de referencia de acuerdo con la norma ISO 17468**
- **Ampliación del alcance de un método validado ISO 16140-2, ejemplo, extensión de categoría o tamaño de porción de ensayo**
- **Modificaciones de los métodos existentes**

La validación en un solo laboratorio es el segundo paso en la estandarización de un método de referencia (ver ISO 17468). Sólo es aplicable a los métodos que están completamente especificados con respecto a todos los parámetros relevantes (incluidas las tolerancias de temperatura y las especificaciones de los medios de cultivo) y que ya se han optimizado.

Por lo tanto, la parte 4 de la ISO 16140 es aplicable a la validación interna de:

- **Métodos utilizados para el análisis (detección o cuantificación) de microorganismos presentes en:**
  - Productos destinados al consumo humano
  - Productos destinados a la alimentación animal
  - Muestras ambientales recogidas de las áreas de producción y manipulación de productos alimenticios para consumo humano o animal
  - Muestras procedentes de la etapa de producción primaria
- **Métodos para la confirmación y tipificación de microorganismos. Esta validación reemplazará solo el procedimiento para confirmación y tipificación de microorganismos de un método específico.**

**Tabla 8:** Número de ensayos para las alternativas para la validación de un método en un solo laboratorio.

Se dispone de método de referencia				No se dispone de método de referencia			
Estudio factorial		Estudio convencional		Estudio factorial		Estudio convencional	
Cuantitativo	Cualitativo	Cualitativo	Cuantitativo	Cualitativo	Cuantitativo	Cuantitativo	Cualitativo
176	236	215	260	128	336	165	460

**Fuente:** ISO 16140-4

En los numerales a continuación, se van a explicar los elementos más importantes de la validación en un solo laboratorio referenciados en la parte 4, bajo la aproximación factorial y convencional, sin pretender ir al detalle de la implementación ya que estos elementos están mejor descritos en la norma ISO.





### 3.1.1.2 CON APROXIMACIÓN FACTORIAL



El término diseño factorial, también llamado experimento factorial o arreglo factorial, se refiere a la selección de diferentes factores o tratamientos de interés que se desean comparar (temperatura, tiempo, etc.) en dos o más niveles (34°C - 37°C, 30 min - 60 min etc.), el objeto en principio es evaluar todas las posibilidades (o permutaciones) dadas por la combinación de los diferentes factores y sus niveles, para establecer el efecto de cada uno de los factores y eventualmente de la interacción entre factores<sup>63</sup>.

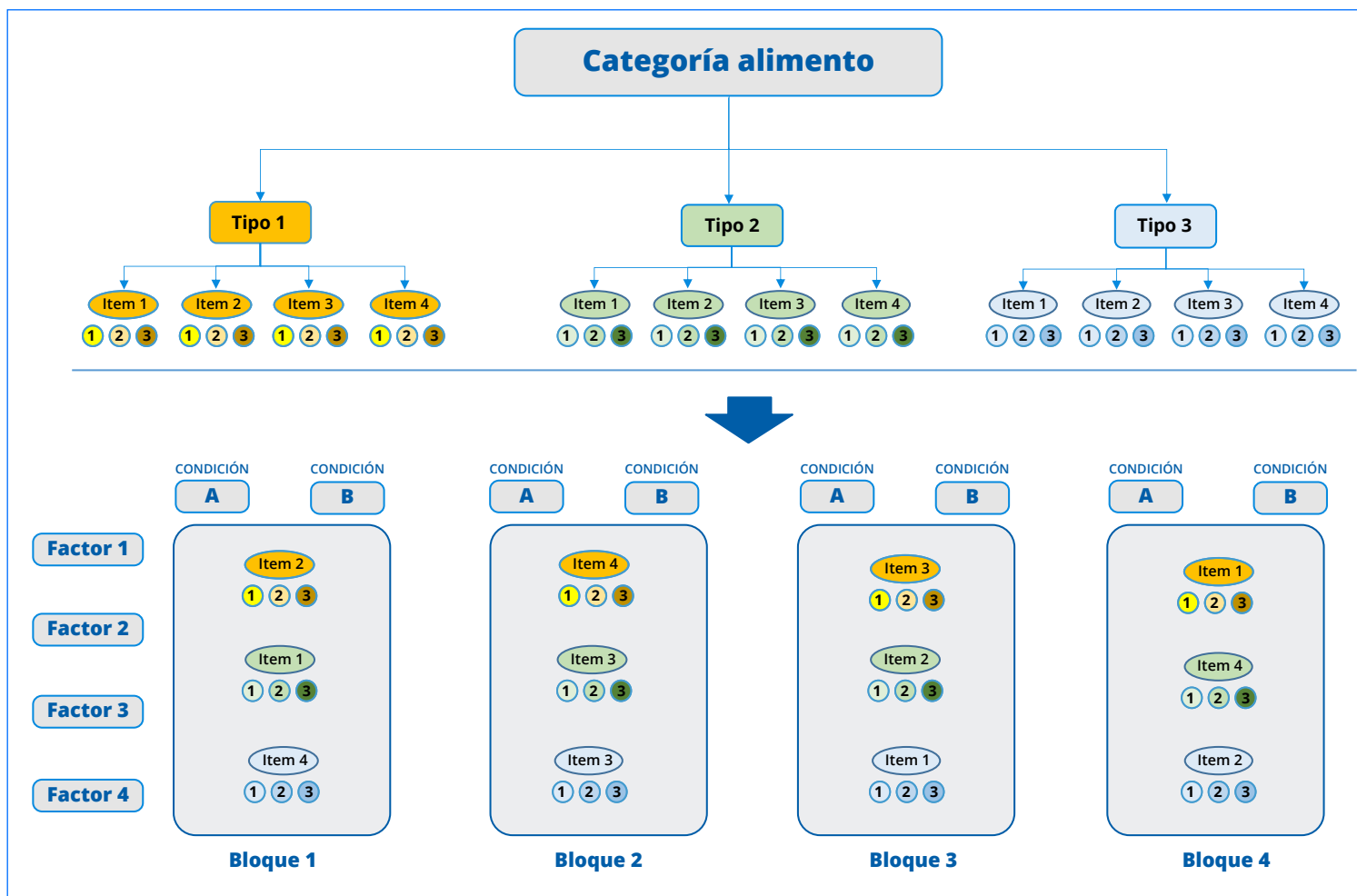
Si se estudia un factor en forma separada, el resultado puede ser diferente al que resultaría de un estudio conjunto, y es más difícil describir el comportamiento general o encontrar la combinación óptima de niveles cuando se hace de forma separada<sup>63</sup>.

Un diseño factorial permite incluir condiciones especiales (factores) que ocurren (pueden variar) en los laboratorios rutinariamente: técnicos, medios de cultivo, matrices de alimentos, tiempos, temperaturas, entre otros. La selección de los factores debe estar basada en el conocimiento del proceso (ver 5.1.1.2.2 de ISO 16140-4)<sup>62</sup>. Al investigar el método en una variedad de condiciones al mismo tiempo, el enfoque factorial permite la generalización de la validación a las condiciones que se encuentran comúnmente en el laboratorio y no se limita a una sola condición. El enfoque de validación factorial en un sólo laboratorio, solamente se puede utilizar para un método completamente desarrollado y optimizado<sup>62</sup>.

En resumen, un diseño factorial presenta las siguientes ventajas:

- **Puede evaluar más de un factor a la vez**
- **Los efectos de un factor deben tener en cuenta los efectos de otros factores** (es más real)
- **Cada observación proporciona información sobre todos los factores. Son experimentos más eficientes**
- **Se pueden estudiar las respuestas de un factor en diferentes niveles de otro factor**

**Figura 4.** Representación diseño factorial para la validación de un ensayo cualitativo frente a un método de referencia.



NOTA: CORRESPONDE 1 A NIVEL L0, 2 A NIVEL L1, 3 A NIVEL L2

Fuente propia: INM, 2021.

En relación con las mediciones:

- Para el nivel L0, seleccionar un ítem de cada tipo de alimento (puede ser un solo bloque), y medir por duplicado, para tener un total de 6 ensayos.
- Para el nivel L1, cada uno de los 12 ítems se evalúa por duplicado bajo las dos condiciones establecidas por el modelo, para un total de 48 ensayos.
- Para el nivel L2 se evalúa sólo una réplica en los 12 ítems, bajo las dos condiciones, para un total de 24 ensayos.

De esta manera, esta metodología sugiere 78 ensayos con el método alternativo a validar y 78 ensayos por el método de referencia, para un total de 156 ensayos. La evaluación de la inclusividad y la exclusividad se realiza de manera independiente, por lo tanto, se requiere por lo menos 50 muestras con diferentes serotipos puros del microorganismo objetivo a evaluar para determinar la inclusividad, y por lo menos 30 cultivos puros de microorganismos no objetivo, para determinar la exclusividad. Así, el estudio requiere un total de 236 ensayos.

El análisis y expresión de los resultados se basa en los resultados obtenidos a partir de las tablas de frecuencia o tablas de 2X2, que permiten establecer las tasas de resultados verdaderos y falsos, tanto de positivos como de negativos y a partir de estos, determinar características de rendimiento tales como la sensibilidad, especificidad, y valores predictivos de la prueba. (Figura 5).

**Figura 5.** Tabla de contingencia para análisis de resultados obtenidos en la validación del método cualitativo alternativo, frente a uno de referencia.

		MÉTODO DE REFERENCIA	
		Positivo	Negativo
Método Alternativo	Positivo	Verdadero positivo (VP)	Falso positivo (FP)
	Negativo	Falso negativo (FN)	Verdadero negativo (VN)

Fuente propia: INM, 2021.

La evaluación del método de ensayo frente al de referencia se hará por categoría y tipo de alimentos seleccionados, con base al efecto calculado para cada uno de los factores evaluados, de acuerdo con los RLOD calculados y unos umbrales establecidos para definir los criterios de aceptación.

Sin un método de referencia, la validación del método varía ligeramente, en lugar de un estudio de comparación basado en el RLOD, todos los cálculos se basan únicamente en los valores  $LOD_{50}$  correspondientes a cada configuración del diseño ortogonal factorial. En este caso, el estudio se realiza utilizando muestras con niveles de contaminación conocidos y el inóculo debe enumerarse utilizando un medio no selectivo <sup>62</sup>.

En la tabla 9, están los parámetros que se determinan y el detalle de cómo hacer los cálculos se puede consultar en la parte 2 de ISO 16140 (ver numeral 3.1.1):

**Tabla 9.** Estudio de validación en un solo laboratorio usando la comparación factorial ortogonal.

<b>Factorial ortogonal cualitativo</b>			
<b>Con método de referencia</b>	<b>Parámetros</b>	<b>Sin método de referencia</b>	<b>Parámetros</b>
<p><b>Diseño experimental:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Total de 12 productos por categoría. Tres niveles de contaminación (cero, bajo y alto) y 4 ítems de alimento de cada tipo.</li> <li>- Se distribuyen al azar los cuatro ítems en 4 bloques diferentes y por cada bloque se usa una cepa diferente o la misma cepa en diferentes condiciones de estrés según la relevancia para el alimento.</li> </ul> <p><b>Ver 5.1.1.2.3 ISO 16140-4</b> <b>Ver Anexo D</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudio de sensibilidad.</li> <li>- Nivel de detección relativo (RLOD).</li> <li>- Inclusividad/exclusividad.</li> </ul>	<p><b>Diseño experimental:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 16 ítems (tipos de alimentos) de cada categoría de alimentos.</li> <li>- Cada ítem se contamina artificialmente con dos niveles bajo (fraccional) y alto, así como, una muestra blanco para cada ítem.</li> <li>- Cada ítem se analiza bajo 2 condiciones diferentes, es decir, combinando los niveles y los 4 factores.</li> </ul> <p><b>Ver 5.1.1.2.3 ISO 16140-4</b> <b>Ver Anexo E</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudio de sensibilidad .</li> <li>- Cálculo de <math>LOD_{50}</math>.</li> <li>- Inclusividad/exclusividad.</li> </ul>

Factorial ortogonal cuantitativo			
Con método de referencia	Parámetros	Sin método de referencia	Parámetros
<p><b>Diseño experimental:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Total de 12 productos por categoría. (4 productos con baja concentración, 4 media concentración y 4 en alta concentración).</li> <li>- Cada grupo es una combinación de los niveles por los cuatro factores a variar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Veracidad relativa y se calcula una total y una separada para cada nivel de cada bloque.</li> <li>- Estudio de precisión: se determina la repetibilidad <i>in-house</i> y la reproducibilidad <i>in-house</i>.</li> <li>- Inclusividad / exclusividad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Los resultados son comparados con los niveles de contaminación artificial inoculada en la muestra.</li> <li>- Si no se conocen los niveles, se hace evaluación de la proporcionalidad es decir los resultados de diferentes niveles de dilución deben ser inversamente proporcionales a el nivel de dilución.</li> <li>- El protocolo de evaluación de la precisión <i>in-house</i> se hace con pasos de dilución adicionales.</li> <li>- La selección de muestras y métodos es igual al protocolo cuando se cuenta con método de referencia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Veracidad relativa.</li> <li>- Estudio de Precisión</li> <li>- Repetibilidad y reproducibilidad <i>in-house</i>.</li> <li>- Inclusividad/ Exclusividad.</li> </ul>

Fuente: ISO 16140-4

La parte 4 de 16140 es muy útil cuando:

- **No se requiere una comparación inter-laboratorio**
- **Cuando se hace el estudio previo del método antes de someterlo a la validación frente a un método de referencia (si aplica)**
- **Cuando se requiere ampliar el alcance del método ya validado, por ejemplo, la extensión de las categorías de alimentos o modificar el tamaño de la porción para analizar**
- **Si es necesario hacer modificaciones a un método existente**

El inconveniente, es la alta cantidad de ensayos requeridos para proceder con la validación.

### 3.1.1.3 CON APROXIMACIÓN CONVENCIONAL



Un enfoque convencional investiga el método para un entorno específico (es decir, un conjunto de condiciones específicas bajo las cuales se realiza el método). Esta aproximación está basada totalmente en el protocolo de la parte 2 de ISO 16140. En el caso de contar con un método de referencia, la validación consiste en comparar frente a este la sensibilidad y el LOD<sub>50</sub> (RLOD).

Un resumen de los enfoques cuando hay disponible un método de referencia, y cuando no hay método de referencia se puede ver en la tabla a continuación (ver tabla 10).

**Tabla 10.** Validación en un solo laboratorio con enfoque convencional

Método	Enfoque factorial	Enfoque convencional	Parámetros
<b>Cualitativo contra método de referencia</b>	Estudio factorial (sensibilidad + RLOD) Estudio Inclusividad/Exclusividad	Estudio sensibilidad Estudio RLOD Estudio Inclusividad/Exclusividad	
<b>Cualitativo sin método de referencia</b>	Estudio factorial (sensibilidad + LOD <sub>50</sub> ) Estudio Inclusividad/Exclusividad	Especificidad Estudio LOD <sub>50</sub> (LOD <sub>50</sub> + sensibilidad) Estudio Inclusividad/Exclusividad	
<b>Cuantitativo contra método de referencia</b>	Estudio factorial (Veracidad relativa + perfil de exactitud + precisión <i>in house</i> ) Estudio Inclusividad/Exclusividad	Estudio veracidad relativa Estudio perfil de exactitud Estudio precisión <i>in house</i> Estudio Inclusividad/Exclusividad (Sin estudio LOQ)	



Método	Enfoque factorial	Enfoque convencional
Parámetros		
<b>Cuantitativo sin método de referencia</b>	Estudio factorial (Veracidad relativa + perfil de exactitud + precisión <i>in house</i> )  Estudio Inclusividad/Exclusividad	Estudio veracidad relativa  Estudio perfil de exactitud  Estudio precisión <i>in house</i> (Sin estudio LOQ)
<p><b>RLOD:</b> Nivel relativo de detección (nivel de detección a <math>P = 0,50</math> (<math>LOD_{50}</math>) del método alternativo (patentado) dividido por el nivel de detección a <math>P = 0,50</math> (<math>LOD_{50}</math>) del método de referencia).</p> <p><b>LOQ:</b> Límite de cuantificación/ determinación (concentración más baja del analito que se puede cuantificar con un nivel aceptable de precisión y veracidad en las condiciones de la prueba).</p> <p><b><math>LOD_{50}</math>:</b> es el nivel de detección para el cual el 50 % de las pruebas dan un resultado positivo.</p>		

**Fuente:** ISP Chile.

En el caso de una validación de un método de ensayo cualitativo, sin contar con un método de referencia, la norma propone evaluar primero la especificidad del método (empleando un conjunto de muestras no contaminadas como blancos), y en una etapa posterior el  $LOD_{50}$ .

El  $LOD_{50}$  se evalúa siguiendo un esquema similar al propuesto en el estudio factorial: por cada categoría se seleccionan 12 ítems que representan 3 tipos de alimentos, cada ítem se evalúa en días diferentes siguiendo un diseño como el de la Figura 6.





Así mismo, otras partes de la familia ISO 16140 se dedican a protocolos de validación, que se pueden seleccionar según la necesidad del laboratorio.

Brevemente, la parte 5 de la serie ISO 16140, la cual especifica los principios generales y los protocolos técnicos basados en estudios factoriales ortogonales para la validación de métodos no comerciales (no patentados/registrados), es una versión usada para hacer validaciones de emergencia en los laboratorios. Es aplicable a la validación de métodos utilizados para el análisis (detección o cuantificación) de microorganismos en:

- **Productos destinados al consumo humano**
- **Productos destinados a la alimentación animal**
- **Muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos y piensos**
- **Muestras de la etapa de producción primaria**

Cabe señalar, en particular, que esta parte de la serie 16140 es aplicable a bacterias y hongos. El documento especifica protocolos para la validación *in house* y el estudio interlaboratorio contra un método de referencia, para métodos tanto cuantitativos como cualitativos y, además, proporciona un protocolo para la validación de métodos cuantitativos sin un método de referencia.

En relación a esto último, los métodos cualitativos no pueden validarse sin un método de referencia, de acuerdo con el protocolo de esta parte de la norma, y solo se aplica a la validación de métodos que están totalmente especificados con respecto a todos los parámetros relevantes (incluidas las tolerancias de temperatura y las especificaciones de los medios de cultivo) y que ya han sido optimizados.

El enfoque de este diseño factorial experimental utilizado permite minimizar hasta cuatro el número de laboratorios requeridos, sumado a la ventaja que, también permite un análisis más detallado de los parámetros de precisión del método y, al mismo tiempo, requiere un número menor de ensayos.

Para el caso de ISO 16140-6 es algo diferente, porque se relaciona con una situación muy específica en la que sólo el procedimiento de confirmación de un método debe validarse, independientemente del método de detección o enumeración (ejemplo: la confirmación bioquímica de *Enterobacteriaceae*). El procedimiento de confirmación avanza desde un resultado presuntivo a un resultado positivo confirmado. También está cubierta la validación de técnicas de tipificación alternativas (ejemplo: serotipificación de *Salmonella*).

El estudio de validación de la parte 6 define claramente los agares selectivos a partir de los cuales se pueden confirmar las cepas, utilizando el método de confirmación alternativo. Si se valida con éxito, el método de confirmación alternativo, solo se puede usar, si las cepas se recuperan en un agar que se usó y demostró ser aceptable dentro del estudio de validación. (Ver tabla 11).



**Tabla 11.** Uso de métodos de confirmación alternativos validados (muestra las posibilidades en las que se puede aplicar un método de confirmación alternativo validado de acuerdo con ISO 16140-6) <sup>64</sup>

Método	Detección	Enumeración	
	Etapas	Etapas	
Método de referencia	Porción de ensayo ⇓ Enriquecimiento ⇓ Aislamiento en agar selectivo	Porción de ensayo ⇓ Enumeración en agar selectivo	
	⇓ Confirmación: bioquímica, inmunológica, molecular, etc	⇓ ⇐	Método de confirmación alternativo validado (validado en el agar específico)
Método alternativo validado según ISO 16140-2	Porción de ensayo ⇓ <b>Procedimiento de Detección</b> ⇓ Confirmación <b>no es incluida</b> en el protocolo del método alternativo o Confirmación <b>es incluida</b> en el protocolo del método alternativo ⇓	Porción de ensayo ⇓ <b>Procedimiento de Enumeración</b> ⇓ Confirmación <b>no es incluida</b> en el protocolo del método alternativo o Confirmación <b>es incluida</b> en el protocolo del método alternativo ⇓	
	¿Alguno de los procedimientos de confirmación para los métodos alternativos se basa en una referencia o se incluye la confirmación a partir de un agar de aislamiento en el estudio de validación de acuerdo con la norma ISO 16140-2?		
	⇓ Si : Cubierto por validación de acuerdo con ISO 16140-6	⇓ No : No cubierto por la validación de acuerdo con ISO 16140-6	

Fuente: ISO 16140-6





# Capítulo 4



VERIFICACIÓN

La verificación es un proceso en el que, mediante evaluación y aportación de evidencia objetiva, un laboratorio establece si está en capacidad de cumplir con los requisitos particulares de un método de ensayo (de referencia o alternativo), para poder implementarlo de manera confiable, de acuerdo con su uso previsto<sup>8</sup>. Es un estudio de una sola vez, destinado a demostrar que el método funciona en el laboratorio, siempre que se usa de acuerdo a las especificaciones del desarrollador del mismo<sup>65</sup>. En este contexto, ISO 16140-3, describe el procedimiento de verificación de método de ensayo en alimentos y establece como requisito, que sólo es aplicable a métodos alternativos o de referencia validados.

Tal como se mencionó en el capítulo 2 de este documento, es importante tener en cuenta el tipo de ensayo que el laboratorio va a implementar, por ejemplo: identificación, detección, enumeración (ver 2.2.1.), y de esa manera confirmar los requisitos que se deben verificar y el desempeño que se debe alcanzar durante la verificación.

Los requisitos particulares están asociados tanto con el alcance como con las características de desempeño del método de referencia o alternativo (precisión, sesgo, límites de detección, entre otras) obtenidos a través de su validación, por lo que, previo al ejercicio de verificación es importante conocerlos. Es necesario identificar el alcance y los alimentos con que fue validado el método seleccionado; aquellos que incluyen al menos 5 categorías declaradas son para *“amplia gama de alimentos”* y aquellos con menos categorías tienen limitado el alcance a las categorías declaradas.

La verificación, por tanto, se centra en los ítems que se encuentran dentro del alcance de la validación y que se encuentren incluidos



en la aplicación del laboratorio que lo va a usar. De esta forma, el laboratorio puede escoger si va a definir el alcance de la verificación para *“amplia gama de alimentos”* o para las categorías seleccionadas.

Estos requisitos normalmente están disponibles con el método de ensayo o a través de su informe de validación, sin embargo, algunos métodos de referencia de microbiología no han publicado los datos de validación o no han sido validados, por lo que no se dispone de un valor de referencia para hacer la verificación<sup>55</sup>, y para esta situación, la parte 3 de la serie ISO 16140:2021 en el Anexo F presenta el *“Protocolo para la verificación en un único laboratorio de métodos de referencia no validados”*.

Conociendo esta situación, el comité técnico ISO/TC 34 de Productos alimenticios, división de microbiología (SC 9) y el comité técnico CEN/TC 463 de Microbiología de la cadena alimentaria, propusieron un período de transición con la intención de dar tiempo a las organizaciones de estandarización para validar los métodos, que aún no se encuentran completamente validados<sup>55</sup>. (Ver numeral 2.1.2).

Al igual que en la validación, en esta etapa es muy deseable contar con un plan de verificación en el laboratorio, que cuente con la aprobación del director técnico. El plan al menos puede incluir<sup>65</sup>:

- **Tipo de verificación y propósito del estudio**
- **Propósito del método y descripción del mismo**
- **Detalles del diseño del experimento:**
  - **Número y tipo de muestras**
  - **Número de réplicas** (incluyendo cuantos días y cuantos analistas)

- Características de desempeño que van a ser evaluadas
  - Registros analíticos y datos estadísticos (evidencia)
  - Criterios de aceptación
- 
- **Materiales y equipamiento necesario**
  - **Consideraciones de bioseguridad**
  - **Tiempo estimado para ejecutar el experimento**
  - **Informe de verificación**
  - **Análisis de causa raíz cuando los resultados obtenidos no son aceptables o no cumplen los límites de aceptabilidad**

Algunos parámetros de desempeño evaluados en la verificación se ven influenciados por el tipo de cepa, los medios de cultivo de enriquecimiento o las matrices de alimento a evaluar<sup>66</sup>. Por esto, es especialmente necesario al planificar los estudios de verificación, obtener toda la información posible del método y contar con un profesional capacitado que tenga la competencia para definir la ruta de implementación, en especial cuando no es claro qué microorganismos usar, qué muestras escoger o cómo interpretar los resultados con microorganismos difíciles como *Campylobacter* spp. (ejemplo: prueba de identificación, serotipificación). En definitiva, que pueda supervisar el proceso.

Así mismo, es muy aconsejable que los laboratorios puedan crear un proceso continuo para monitorear y reevaluar el ensayo, que les permita determinar si el método continúa cumpliendo con el propósito deseado, comprender la población de muestras que analiza o que va a analizar, la razón por la cual se realiza la prueba, además de los

costos, el control de la calidad y la capacitación que están asociados con la prueba y que son igual de importantes para garantizar la confiabilidad del laboratorio.

Dentro de las alternativas de protocolos relacionados a la verificación de método en microbiología de alimentos, es importante señalar que NMKL (Nordic Committee on Food Analysis) dispone de un documento técnico que proporciona pautas sobre la manera en que<sup>67</sup>:

- **Un laboratorio puede verificar que es capaz de realizar un método analítico que ha sido previamente validado externamente.**
- **Un laboratorio puede evaluar la posibilidad de analizar matrices adicionales no cubiertas por la validación primaria, o incluir nuevas matrices en el alcance de un método ya verificado.**
- **Un laboratorio debe planificar una verificación y elaborar un informe de verificación.**

El procedimiento es aplicable a la verificación de métodos ya validados adecuadamente en un estudio entre laboratorios, y también a métodos estandarizados bien reconocidos sin validación y características de desempeño especificadas. El procedimiento también describe cómo se podría establecer la incertidumbre de medida durante la verificación del método, ya que los datos obtenidos en la verificación se pueden utilizar en la evaluación del mismo.

De otro lado, ISO cuenta con este nuevo estándar multiparte que es la familia de las normas ISO 16140, las cuales proporcionan protocolos específicos, estandarizados y armonizados con las pautas para la validación y/o verificación de métodos; ya sean propietarios o no. La parte 3 de ISO 16140, se enfoca en la verificación de mé-

todos de referencia y de métodos alternativos validados. Establece como parámetro de evaluación el  $LOD_{50}$  para métodos cualitativos y, la desviación estándar de reproducibilidad dentro del laboratorio y el sesgo como parámetros de precisión y veracidad para métodos cuantitativos. Esta versión simplifica el proceso con respecto a versiones anteriores, cuando sólo se disponía de documentos para validación y donde quedaba a criterio de los laboratorios los parámetros de verificación a evaluar.

De acuerdo a esta norma, la verificación de un método de ensayo para alimentos se puede adelantar en dos partes: **1)** la verificación de implementación y **2)** la verificación del tipo (ítem) de alimento. Sin embargo, la aplicación de una o de las dos partes va a depender de la disponibilidad de la información de los datos de validación del método (de referencia o alternativo) seleccionado. Al respecto, las opciones son:

- Si el método cuenta con los datos de validación publicados, se hace una verificación del tipo de alimento y de la implementación.
- Si, por el contrario, no es un método validado o no se encuentran los datos de validación publicados, se hace la verificación solo de tipo de alimento (ver anexo F de ISO 16140-3:2021).

**Nota:** En este anexo se detalla la verificación del tipo de alimento/ítem para métodos no validados cualitativos y cuantitativos.

- **Verificación de implementación:** va antes que la verificación de tipo de alimento. El propósito de esta verificación es que el laboratorio pueda demostrar su competencia para ejecutar el método de referencia seleccionado de manera confiable y eficiente, es decir correctamente.

El laboratorio prueba un ítem (alimento) que se utilizó en el estudio de validación (para métodos cualitativos) y cualquier ítem dentro del alcance de la validación (para métodos cuantitativos) y finalmente compara el resultado obtenido de la verificación con el resultado obtenido en la validación. El proceso varía según el tipo de método y en términos generales es así:

- **Cualitativos:** la norma indica que el laboratorio debe seleccionar un tipo de alimento de los empleados en la validación, que, en lo posible, esté dentro del alcance de la aplicación del laboratorio. Se debe emplear la misma cantidad de muestra, tal como lo establece el método de referencia. Tener en cuenta las indicaciones para la preparación de la muestra para análisis que indique el método y seguirlas al pie de la letra.

*Nota:* la verificación de implementación solo aplica para métodos validados con datos publicados (ver Tabla 12).

- **Cuantitativos:** El laboratorio puede seleccionar un tipo de alimento que esté incluido en el alcance de la validación, pero que no necesariamente se haya probado en la validación.
- **Verificación del tipo de alimento, o verificación de la matriz específica del alimento:** Su propósito es demostrar que el laboratorio es capaz de analizar los ítems (alimentos) que decide según el alcance de aplicación, los cuales, a su vez, deben estar dentro del alcance de la validación y que sean comúnmente examinados por el labora-

torio. Como no todos los ítems (alimentos) se pueden incluir en la verificación, se le pide al laboratorio que escoja y analice los alimentos desafiantes, por lo que el laboratorio necesita:

- Seleccionar un alimento (en lo posible que represente un desafío para el laboratorio) de cada una de las categorías incluidas en el alcance de la validación, que también correspondan a una de las categorías incluidas en el alcance de aplicación del laboratorio, empleando el mismo tamaño de muestra (o menor si así lo mide en la rutina el laboratorio).

*Nota:* alimentos desafiantes incluyen con baja disponibilidad de agua, alto contenido de grasa, con pH ácido, alimentos que por su naturaleza están compuestos de microorganismos (probióticos o fermentados).

**Tabla 12.** Resumen del número mínimo de ítems (alimentos) necesarios para la verificación

Alcance de la validación	Número de muestras		
	Verificación Implementación	Verificación ítem (alimento)	Total
Alcance $\geq 5$ categorías de alimentos para "Amplia gama de alimentos"	1	$\geq 5$	$\geq 6$
Alcance categoría $N_{\text{alimentos}}$ para "Limitada gama de alimentos"	1	$N_{\text{alimentos}} \leq 4$	$(N_{\text{alimentos}} + 1) \leq 5$
Alcance para "Amplia gama de alimentos" de + otras categorías ( $N_{\text{otros}}$ )	1	$\geq 5$ ítems alimento + 1 ítem a partir de cada una de las otras categorías $N_{\text{otros}}$	$\geq 6 + N_{\text{otros}}$
Alcance para "Limitada gama de alimentos" $N_{\text{categorías}}$ de alimentos + otras categorías ( $N_{\text{otros}}$ )	1	$N_{\text{otros}} \leq 4$ + 1 ítem a partir de cada una de las otras categorías $N_{\text{otros}}$	$(N_{\text{alimentos}} + N_{\text{otros}} + 1) \leq 8$
Solo alcance de otras categorías ( $N_{\text{otros}}$ )	1	$N_{\text{otros}} \leq 3$	$(N_{\text{otros}} + 1) \leq 4$

Fuente: ISP Chile



En relación con los parámetros de desempeño a verificar, ISO 16140-3 los define en función del tipo de verificación y de la disponibilidad o no, de un método de referencia con datos de validación (ver tabla 13).

**Tabla 13.** Validación en un solo laboratorio con enfoque convencional

Tipo de método	Parámetros de desempeño	Tipo de verificación	
	Verificación (parte 3)	Verificación de implementación	Verificación de tipo de alimento
<b>Métodos validados</b>			
<b>Métodos cualitativos</b>	Límite de detección (LOD <sub>50</sub> )	si	si
<b>Métodos cuantitativos</b>	Desviación estándar de la reproducibilidad intra-laboratorio	si	no aplica
	Sesgo estimado	no aplica	si
<b>Métodos no validados</b>			
<b>Métodos cualitativos</b>	Límite de detección (LOD <sub>50</sub> )	no aplica	si
<b>Métodos cuantitativos</b>	Sesgo estimado	no aplica	si

Fuente: ISO 16140-3

En cuanto a la verificación de los kits o ensayos comerciales (métodos alternativos), como ya se había mencionado, la validación de estos métodos en particular la debe hacer con un tercero evaluador reconocido (AFNOR, NordVal, Microval, AOAC, entre otros) por lo que el informe y datos de validación normalmente están disponibles. En este sentido, la FDA, por ejemplo, recomienda que la verificación *in-house* (interna) del método alternativo sea para las matrices incluidas en el estudio colaborativo y que se seleccionaron para la verificación interna de primer uso del kit. Una extensión de la matriz requiere un estudio de validación del método<sup>8</sup>, así como también los cambios en las diluciones a trabajar o tiempos de incubación<sup>65</sup>.



A continuación, se relacionan las instrucciones para adelantar la verificación de kits de diagnóstico microbiológicos según las indicaciones de FDA<sup>8</sup>:

- **Inocular cualquier matriz incluida dentro del alcance del método, con un nivel de inóculo cercano al límite de detección. Se sugiere trabajar con la matriz o matrices más frecuentes en el laboratorio usuario.**

**Hacer 6 réplicas de la matriz inoculada y 6 de la no inoculada.**

- **Registrar resultados falsos positivos y falsos negativos observados y verificar el desempeño frente a los datos reportados.**
- **Si no se obtienen falsos positivos o falsos negativos se entiende verificado el método para el laboratorio usuario para cualquier matriz declarada en el alcance del kit.**

Si no hay datos disponibles del sistema de prueba comercial (kit), el laboratorio usuario es responsable de completar la validación del método<sup>6</sup>; razón por la cual, es importante seleccionar un kit adecuado a la necesidad y que haya surtido el proceso de validación por una entidad competente.

## 4.1 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO O CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO PARA VERIFICACIÓN

### 4.1.1 CUALITATIVOS

#### 4.1.1.1 LOD<sub>50</sub> ESTIMADO (eLOD<sub>50</sub>)



El LOD<sub>50</sub> estimado (eLOD<sub>50</sub> por sus siglas en inglés) es uno de los parámetros más relevantes en cuanto a la verificación de los métodos microbiológicos ya que emplea un menor número de muestras con respecto a lo indicado para el LOD en la validación (ISO 16140-2), es por este motivo se denomina “estimado” (ISO 16140-3)<sup>55</sup>. El eLOD<sub>50</sub> es el único parámetro que se estima para los métodos cualitativos y se hace tanto en la verificación de implementación como en la verificación de tipo de alimento.

La determinación del eLOD<sub>50'</sub> requiere 3 niveles de inoculación (bajo, intermedio y alto) y para poder establecer este valor estimado, se basa en el número de resultados positivos por nivel de contaminación. La contaminación se puede hacer con material de referencia en una concentración conocida baja o con la estandarización del inóculo *in-house*.

La determinación del eLOD<sub>50'</sub> requiere 3 niveles de inoculación (bajo, intermedio y alto) y para poder establecer este valor estimado, se basa en el número de resultados positivos por nivel de contaminación. La contaminación se puede hacer con material de referencia en una concentración conocida baja o con la estandarización del inóculo *in-house*.

El objeto del eLOD<sub>50</sub> es estimar el nivel de detección, con una probabilidad de detección del 50% (ver definiciones) y compararlo con el eLOD<sub>50</sub> del método de referencia, de manera que se pueda demostrar que el ensayo realizado en el laboratorio se desempeña (detecta) dentro de los límites adecuados con respecto al método de referencia. La norma propone tres protocolos para determinar el eLOD<sub>50</sub> estimado (ver tabla 14), dependiendo de la disponibilidad de materiales de referencia cuantificados o de la habilidad del laboratorio en la preparación del inóculo (y por lo tanto en conseguir el nivel deseado de contaminación). Ver anexo ejemplo: Verificación método de detección

- **Los dos primeros protocolos aplican cuando se usan cepas sin concentración conocida, por lo que el laboratorio debe establecer la concentración del inóculo:**
  - En el primer protocolo, se propone preparar muestras de ensayo contaminadas en tres niveles de concentración: 1, 3 y 9 veces el  $LOD_{50}$  del método de referencia, y un blanco. Evaluando 1 réplica para el nivel más alto, 4 réplicas para los más bajos y 1 para el blanco (que es la que el laboratorio debe evaluar primero).
  - En el segundo protocolo, se preparan solo dos niveles de concentración: 1 y 3 veces el  $LOD_{50}$  del método de referencia y el blanco. Evaluando 3, 4 y 1 réplicas respectivamente. La norma recomienda emplear éste protocolo por si no resulta como se esperaba el desempeño con el primer protocolo.
- **La aplicación del tercer protocolo depende de la disponibilidad de MR cuantificados, ya que requiere la preparación de una muestra contaminada entre 3 - 5 UFC / porción de ensayo haciendo 7 réplicas. Usando este protocolo no se calcula el  $eLOD_{50}$ . El resultado de la verificación del  $LOD_{50}$  del método de referencia se cumple si al menos 6 de las 7 réplicas son positivas, obteniendo conteos menores o iguales a 5 UFC /porción de ensayo.**

*Nota:* En los métodos de microbiología no siempre es posible una determinación exacta de los niveles absolutos de contaminación. Por este motivo, la ISO 16140-2 propone un enfoque que se basa en la relación de los valores LOD de una referencia y un método alternativo. Al igual que en el caso del LOD, para este LOD estimado ( $eLOD$ ) se pueden calcular tanto parámetros de precisión promedio como de reproducibilidad<sup>68</sup>.

**Tabla 14.** Resumen diseño experimental para verificación del eLOD<sub>50</sub>

Nivel de inoculación de la porción de ensayo						
Protocolo	Nivel alto 9 x LOD <sub>50</sub> / porción ensayo	Nivel medio 3 x LOD <sub>50</sub> / porción ensayo	Nivel bajo 1 x LOD <sub>50</sub> / porción ensayo	3 a 5 UFC/ 4 porción ensayo	Blanco	Número total de replicados
1	1	4	4	----	1	10
2	----	3	5	----	1	09
3	----	----	—	7	1	08

Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
Se puede utilizar cuando no hay certeza de lograr el nivel deseado de contaminación de las porciones de ensayo. Esto es relevante cuando se usa un cultivo sin conocimiento previo del nivel real del inóculo para inocular las porciones de ensayo.	Se puede utilizar si el primer protocolo elegido no funcionó como se esperaba y el experimento debe repetirse. Se pueden utilizar diluciones adicionales a las prescritas para cualquiera de los protocolos para minimizar la necesidad de repetir el experimento cuando los niveles de inoculación no cumplen con los requisitos.	Se puede utilizar cuando se conoce el nivel de contaminación del inóculo, cuando se utiliza un material de referencia con concentración conocida.

**Fuente:** ISO 16140-3

Como se expuso anteriormente, de manera general, la norma propone evaluar diferentes niveles de concentración (los niveles son múltiplos del LOD<sub>50</sub> del método de referencia) y un blanco, con un número de réplicas determinado y a partir de los resultados obtenidos; positivos y negativos para cada uno de los niveles evaluados, se aplica una regresión logística que calcula el valor de concentración que produciría una fracción de resultados positivos equivalente al 50%, y establece este valor como el eLOD<sub>50</sub>. Por facilidad, la norma trae tabulados los valores del eLOD<sub>50</sub>, de acuerdo a la combinación de positivos obtenidos para cada nivel evaluado, dato que debe ser multiplicado por el nivel más bajo inoculado (LIL por sus siglas en inglés) para calcular el valor del eLOD<sub>50</sub>, facilitando así su cálculo.

El criterio de aceptación definido es que el  $eLOD_{50}$  debe ser menor a 4 veces el  $LOD_{50}$  del método validado.

$eLOD_{50} < 4 * LOD_{50}$

EC. 2

**Nota:** Cuando la verificación del ítem/ alimento no se puede hacer con un alimento igual al utilizado en la validación, es necesario tener en cuenta que el criterio de aceptación se asume como máximo 4 UFC/ por porción de ensayo.

La evaluación del  $eLOD_{50}$  se hace en UFC/ porción de ensayo, por lo que es importante verificar las unidades con las que se reporta el  $LOD_{50}$  del método de referencia (UFC/mL, UFC/g), de manera que estas sean transformadas en unidades por porción de ensayo, para poder establecer la comparación de la ecuación 2 (EC.2).

*Ejemplo para calcular el  $eLOD_{50}$  usando la tabla de ISO 16140-3:*

*En la verificación de un método para la detección de Campylobacter spp (ISO 10272-1:2017), se establece como  $LOD_{50}$  de 2.2 UFC/ 10 g de carne de res picada (Porción de ensayo). Siguiendo el protocolo 1, para la estimación del  $eLOD_{50}$  se prepararon muestras con niveles de contaminación de 9, 3 y 1 vez el  $LOD_{50}$  obteniendo los resultados descritos en la tabla 15:*

**Tabla 15.** Cálculo del  $LOD_{50}$  estimado para el método de *Campylobacter spp* (ISO 10272-1:2017).

	<i>Nivel medio</i> $9 * LOD_{50}$	<i>Nivel medio</i> $3 * LOD_{50}$	<i>Nivel bajo (LIL)</i> $1 * LOD_{50}$	<i>Blanco</i>	$eLOD_{50}$
<b>Concentración UFC / 10 g muestra</b>	18	6	2	0	1
<b>Número de Réplicas</b>	1	4	4	1	1
<b>Resultados Positivos</b>	1	4	2	0	1

**Fuente propia:** INM.

De acuerdo con la norma, para esos resultados, el  $eLOD_{50}$  corresponde al valor de concentración del nivel más bajo inoculado ( $LIL = 2 \text{ UFC}/10 \text{ g}$ ) multiplicado por 0.7 (factor  $eLOD_{50}$  de la tabla 6 de la norma ISO 16140-3), dando como resultado  $1.4 \text{ UFC}/10 \text{ g}$  de muestra.

De acuerdo con la ecuación 2, el  $eLOD_{50}$  cumple con el criterio de aceptación establecido, de ser menor a 4 veces el  $LOD_{50}$  del método de referencia. De esta forma, el laboratorio demuestra que es competente para realizar el método de referencia para la detección de *Campylobacter spp.* (ISO 10272-1) en carne de res picada de manera confiable.

Ver anexo ejemplo: Verificación método de detección

La evaluación del  $eLOD_{50}$ , requiere la preparación y estandarización de inóculos de cepas (cuando no se dispone de MR cuantificados); en matrices y niveles de concentración de acuerdo con los métodos de referencia seleccionados. La preparación de los inóculos se hace a partir de un cultivo del microorganismo objetivo, confirmando la concentración del inóculo por recuento en placa, o por NMP (ver ISO 11133 numeral 5.4), se realiza una enumeración preliminar de la suspensión microbiana que se utilizará para la verificación del método con la finalidad de contar con una estimación de la concentración del inóculo que se espera utilizar. Para el caso de los MR cuantificados, se limita a la preparación de las concentraciones haciendo las diluciones necesarias dependiendo de la concentración inicial de la cepa.

**Tabla 16.** Nivel de inoculación por protocolo

Nivel de inoculación de la porción de ensayo				
Protocolo	Nivel alto $9 \times LOD_{50}$ / porción de ensayo	Nivel medio $3 \times LOD_{50}$ / porción de ensayo	Nivel bajo $1 \times LOD_{50}$ / porción de ensayo	3 a 5 UFC/ 4 porción de ensayo
1	Esto debería ser como máximo nueve veces el $LOD_{50}$ esperado.	Desde el nivel alto de inoculación, realice una dilución 1:3 para alcanzar el nivel intermedio.	Desde el nivel de inoculación intermedio, realice una dilución 1:3 para lograr el nivel bajo.	----



Nivel de inoculación de la porción de ensayo				
Protocolo	Nivel alto 9 x LOD <sub>50</sub> / porción de ensayo	Nivel medio 3 x LOD <sub>50</sub> / porción de ensayo	Nivel bajo 1 x LOD <sub>50</sub> / porción de ensayo	3 a 5 UFC/ 4 porción de ensayo
2	----	Esto debe ser como máximo tres veces el LOD <sub>50</sub> esperado.	Desde el nivel de inoculación intermedio, realice una dilución 1:3 para lograr el nivel bajo.	----
3	----	----	—	Se conoce el nivel de contaminación del inóculo, (por ejemplo, material de referencia con concentración conocida).

**Fuente:** ISO 16140-3

**Nota:** Se pueden probar más diluciones para garantizar que se incluyan los niveles objetivo. Utilizar tantas diluciones como sean necesarias, pero siempre tener en cuenta un factor de dilución de 1:3 entre los niveles. Estas diluciones son seriadas, 1:3 corresponde a que por cada volumen de solución se añaden tres volúmenes de solvente<sup>55</sup>.

Es importante mencionar, entre otros, que los errores de volumen de diluyente tendrán un efecto acumulativo en cualquier serie de diluciones en serie y, por lo tanto, pueden tener un efecto importante en los recuentos de colonias.

La selección de los ítems y la cantidad de éstos va a depender del tipo de verificación que se va a hacer, así las cosas:

- **En la verificación de implementación, seleccionar al menos 1 ítem de una categoría validada.**
- **Para la verificación de alimento, seleccionar el número de ítems, según las categorías a verificar, que deben estar dentro del alcance de validación del método escogido por el laboratorio (ejemplo: si el alcance de la verificación es de 3 categorías, se escoge mínimo 1 alimento “difícil o desafiante” por cada categoría)<sup>55</sup>.**

- **Escoger y seguir el protocolo escogido para determinar eLOD<sub>50</sub>.**

Las muestras de alimentos se inoculan directamente en la suspensión inicial de cada muestra y se escogen cepas de microorganismos, ojalá de las recuperadas de las categorías de alimentos escogidas. Paralelo a la inoculación, la norma sugiere sembrar en agar plate count para confirmar la concentración del inóculo adicionado, en este punto, las réplicas de cada inóculo deben ser suficientes para estimar la concentración válida porque se está trabajando con niveles bajos de concentración de microorganismos<sup>55</sup>.

En el caso que no se dispone de método de referencia, y por lo tanto de un valor de LOD<sub>50</sub>, la norma sugiere emplear como valor de referencia 1 UFC / porción de prueba, aplicando el mismo criterio de aceptación de la ecuación 2. Así mismo, hay unos criterios de aceptación para esta categoría de métodos definidos que permiten orientar al laboratorio en la evaluación del método verificado<sup>55</sup>.

En resumen, para los límites de aceptabilidad, el eLOD<sub>50</sub> determinado según el protocolo 1 o el protocolo 2 debe compararse con el LOD<sub>50</sub> del estudio de validación. Para la verificación de la implementación, usar el valor LOD<sub>50</sub> correspondiente al ítem (alimento) probado.

Para la verificación del tipo de alimento o de matriz específica de alimento, el eLOD<sub>50</sub> no deberá ser  $> 4 \times \text{LOD}_{50}$  observado en el estudio de validación. Si ningún valor LOD<sub>50</sub> corresponde al tipo de alimento probado, el eLOD<sub>50</sub> no debe ser  $> 4 \text{ UFC/porción de ensayo}$ . Este límite de aceptabilidad se basa en el valor teórico de un LOD<sub>50</sub> de 1UFC/porción de ensayo.

Para el protocolo 3, deberá haber un mínimo de seis resultados positivos de las siete réplicas analizadas.



## 4.1.2 CUANTITATIVOS



De acuerdo con la Tabla 13, en el caso de los métodos cuantitativos los parámetros a evaluar dependen del tipo de verificación (implementación o del ítem alimento), así como de la disponibilidad de datos de validación del método de referencia. Son éstos: un parámetro de dispersión, por ejemplo, la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio y, un parámetro de veracidad, como el sesgo.

En relación con el parámetro de dispersión (precisión), normalmente el concepto de reproducibilidad se emplea para referirse al máximo grado de variación al que puede ser sometido un método de ensayo que puede incluir diferentes sistemas de medición, analistas, días, distintos lotes de producción de medios de cultivos, diferentes laboratorios. En este caso, se emplea el término “reproducibilidad intralaboratorio” y se refiere al sometimiento del método de ensayo a diferentes condiciones de variación pero evaluadas dentro del mismo laboratorio, como son operadores, equipos, reactivos, días etc., por lo que se podría asimilar al concepto de precisión intermedia más conocido en los ensayos químicos.

### 4.1.2.1 DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO



Aplica para la verificación de la implementación del método, el objetivo es calcular la variabilidad del método bajo el efecto de diferentes factores de variación en el laboratorio y compararlo con la menor variabilidad obtenida en el estudio interlaboratorio para la validación del método.

Como su nombre lo indica, se mide a través de la desviación estándar de reproducibilidad dentro del laboratorio ( $S_{IR}$ ), que corresponde a la incertidumbre técnica y es uno de los tres componentes principales de la incertidumbre (técnica, matricial y distribucional) descritos en la

norma ISO 19036:2019 y es calculada a partir de los recuentos obtenidos por muestras pareadas medidas bajo diferentes condiciones. El criterio de aceptación está dado en la ecuación 3:

$$s_{IR}(\text{método verificado}) < 2 \times s_R(\text{método validado})$$

$s_{IR}$ : desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio

$s_R$ : desviación estándar de reproducibilidad interlaboratorio

EC. 3

El diseño del estudio incluye como mínimo 10 muestras del mismo ítem (alimento) que esté incluido en el alcance de la validación del método de referencia, que representen la variabilidad natural de la población (ejemplo diferentes lotes, diferentes proveedores, etc) y que cubran el intervalo de concentración natural encontrado en las muestras analizadas en el laboratorio, para lo cual se pueden fortificar.

Vale la pena mencionar, que las condiciones de evaluación con diferentes analistas, lotes de producción de medios de cultivos y reactivos, así como diferentes cepas, son responsables de la mayor variabilidad en los resultados de los análisis.

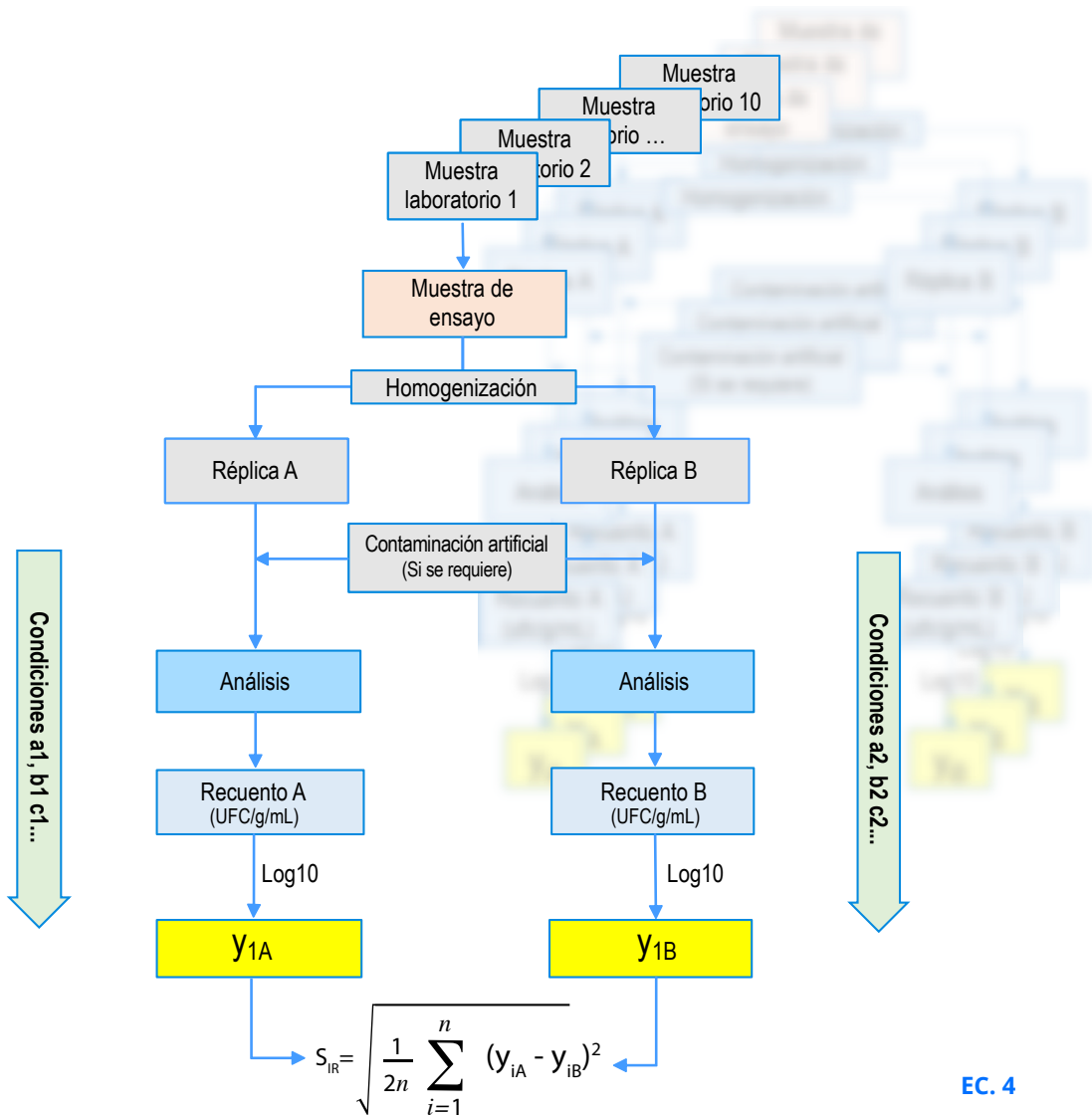
La desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio ( $s_{IR}$ ), se determina de acuerdo con la Figura 7, es independiente de la matriz ya que los experimentos están diseñados para excluir contribuciones de la heterogeneidad de la matriz, por lo que se puede seleccionar cualquier ítem (alimento) dentro del alcance de la validación. Se recomienda seleccionar un ítem (alimento) que pueda homogeneizar eficazmente para minimizar el efecto de la incertidumbre de la matriz.

Se requiere la preparación del inóculo, para lo cual se pueden escoger alimentos naturalmente contaminados, se pueden considerar el uso de cepas de una colección de cultivos (de una colección propia del laboratorio) o un material de referencia. Si el laboratorio no dispone de material de referencia de concentración conocida, debe estimar el nivel de concentración (fase estacionaria o usar densidad óptica) en UFC/mL de la cepa cultivada en medio líquido en condiciones que permitan un óptimo desarrollo<sup>31</sup>. Ver numeral 2.3 de este documento.

El inóculo preparado se introduce directamente en la suspensión inicial de las porciones de ensayo individuales.

Cada muestra debe ser homogeneizada y a partir de esta se divide en dos porciones iguales (Réplicas A y B), las cuales serán medidas por el método de ensayo a verificar, pero bajo diferentes condiciones, es decir, deben variar de tantas maneras como sea posible dentro del alcance de la validación (que pueden ser: analistas (a), equipos (b), lotes de reactivos/medios de cultivo (c), diferentes cepas (d), entre otras) de manera que cubran la variabilidad normal que podría tener el método en el laboratorio. Ver figura 7.

**Figura 7.** Proceso para determinación  $s_{IR}$  de un alimento en un laboratorio



donde:

**i** : índice de las muestras del laboratorio,  $i=1$  hasta  $n$  ( $n \geq 10$ )

**n**: número de muestras

**$y_{iA}$ ,  $y_{iB}$** :  $\log_{10}$  de los recuentos de las muestras A y B respectivamente obtenidos por el método de ensayo con las condiciones a, b y c aplicadas.

La  $S_{IR}$  (ecuación 4 EC. 4) se calcula a partir de la raíz de la suma de las diferencias cuadráticas entre los  $\log_{10}$  de los recuentos obtenidos para cada una de las réplicas, esto para cada una de las 10 muestras (alimentos) seleccionadas. Ver figura 7 y EC. 4.

El límite de aceptabilidad o criterio de aceptación será:

La desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio ( $S_{IR}$ ) del método verificado que debe ser  $\leq 2$  veces el valor medio más bajo de la desviación estándar de reproducibilidad interlaboratorio ( $S_R$ ) hallado para los ítems (alimentos) evaluados en el estudio de validación Ecuación 3 EC. 3

$$S_{IR} \leq 2 \times S_R$$

Cuando sólo se determina un valor ( $S_R$ ) en el estudio de validación, la ( $S_{IR}$ ) del método verificado se compara solo con ese valor reportado. Será evaluado de la misma forma, no debe ser  $\leq 2$  veces la desviación estándar de reproducibilidad ( $S_R$ )<sup>55</sup>.

Ver anexo ejemplo: Verificación método de enumeración. Verificación de implementación.

Dado que el criterio de aceptación requiere comparar los valores del laboratorio contra los obtenidos en la validación del método, este parámetro no aplica para la verificación de métodos cuantitativos no validados.

#### 4.1.2.2 SESGO ESTIMADO (eBias)



##### Generalidades del sesgo en microbiología

El valor verdadero no se puede probar con el resultado de un método microbiológico, por eso, la mejor forma de obtener el valor de referencia es por medio de consenso y se puede hacer: comparando los resultados con otro método de medición, con el promedio del valor de un material de referencia certificado dado por el productor o con el promedio de las observaciones en diferentes laboratorios en trabajos de aseguramiento de la calidad <sup>11</sup>.

Sin embargo, las anteriores no son aproximaciones prácticas. En los laboratorios se puede aproximar al valor verdadero es a través de cultivos de cepas puros o con muestras esterilizadas adicionadas y usando un método no selectivo para estimar el valor verdadero (ver numeral 5.4 de ISO 16140-3, o ver numeral 5 de ISO 11133) <sup>55,31</sup>.

Se debe aclarar, que el cálculo de la recuperación absoluta en microbiología no es factible, la mejor forma de estimar cuantitativamente el sesgo es a través de la recuperación relativa <sup>49</sup>. En los métodos de medición microbiológicos cuantitativos, las unidades usadas para informar los resultados son UFC, estas unidades son en realidad una aproximación al número real de células en la muestra, lo que se convierte en una limitación en la capacidad de conocer la verdadera cantidad de analito en la muestra o porción analizada. La recuperación es relativa.

De otro lado, la recuperación usando MRC con concentraciones conocidas de microorganismos permite comparar los resultados con un valor asignado como “verdadero”, certificado por el productor de material. Ver numeral (1.3) para buscar materiales de referencia disponibles.



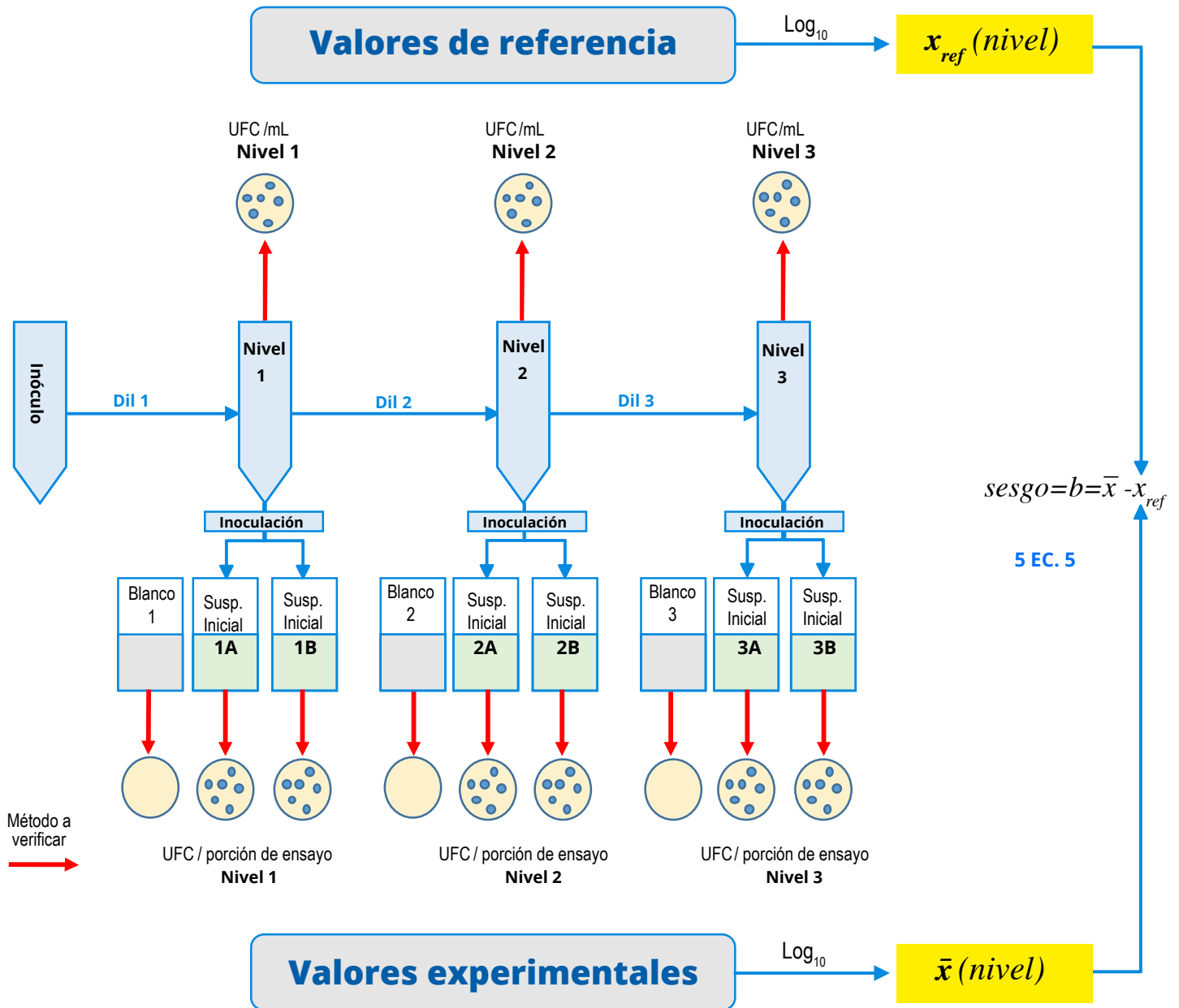
## Determinación

El sesgo estimado aplica para la verificación del tipo de alimento, tanto para métodos validados como no validados, que hace referencia a la diferencia o proximidad entre los resultados de los recuentos obtenidos para un conjunto de muestras inoculadas y el inóculo, en tres niveles de concentración. Como criterio de aceptación se tiene que este debe ser menor o igual a  $0.5 \text{ Log}_{10}$ .

De manera general, el diseño experimental propuesto en la norma para su evaluación, contempla las siguientes etapas:

- Seleccionar al menos una muestra (un ítem) de alimento, preferiblemente la más desafiante técnicamente de cada una de las categorías de alimentos requeridas, teniendo en cuenta tanto el alcance del método, así como el alcance de la aplicación del laboratorio.
- Contaminar artificialmente, por duplicado, la muestra de alimento en tres niveles de concentración representativos de los niveles de contaminación natural de las muestras que van a ser analizadas en el laboratorio. Se recomienda emplear materiales de referencia, cepas de colecciones reconocidas.
- Hacer el recuento con el método a verificar, tanto de las muestras contaminadas como de las diluciones del inóculo usado .
- Analizar con el método a verificar un blanco o control negativo: una muestra con diluyente pero sin inóculo, esto con el objeto de determinar el recuento de la microbiota con que viene la muestra seleccionada. Los resultados de estos controles negativos se registran y pueden proporcionar información útil cuando se requiere un análisis de causa raíz.
- Se evalúan los resultados, expresados como la diferencia absoluta entre la concentración del inóculo usado y la concentración en la muestra artificialmente contaminada

**Figura 8.** Proceso para evaluar el sesgo del método en el proceso de verificación de un método



$$b = \bar{x} - x_{ref}$$

$\bar{x}$  = promedio de los  $\text{Log}_{10}$  UFC por porción de ensayo

$x_{ref}$  =  $\text{Log}_{10}$  de UFC por mL de inóculo

El criterio de aceptación es que el sesgo ( $b$ ), debe ser menor o igual a  $0.5 \text{ Log}_{10}$  (ver figura 8, Ecuación 5). Se expresa como valor absoluto.

O en términos relativos en porcentaje (Ecuación 6):

$$b (\%) = \frac{\bar{X} - X_{ref}}{X_{ref}} \times 100$$

EC. 6

$\bar{X}$  = Media de los resultados

$X_{ref}$  = Valor de referencia adecuado

Para el cálculo del sesgo, se comparan los resultados obtenidos a partir de la concentración del inóculo (en Log<sub>10</sub> UFC /mL) con el de las muestras analizadas (Log<sub>10</sub> UFC / Porción de ensayo).

La preparación de los inóculos y los cálculos de la concentración de bacterias inoculadas en las muestras son actividades relevantes para hacer la estimación de los parámetros. A continuación, un ejemplo para ilustrar:

- **Inóculo de E.coli preparado en el laboratorio:**  
**1115 UFC/g ( 3.05 Log<sub>10</sub> UFC/g)**
- **Muestra (ítem) de alimento contaminado:**  
**1200UFC/10g ( 3.08 Log<sub>10</sub> UFC/10 g)**

EL cálculo del sesgo estimado es :

$$3.05 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g} - 3.08 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/10 g} = 0.03 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/10 g}$$

Ver anexo ejemplo: Verificación método de enumeración. Estimación del sesgo

La tabla 17 siguiente resume los criterios de aceptación los límites de aceptabilidad para los parámetros evaluados durante la verificación del método:

Características de desempeño	Método cualitativo	Método cuantitativo	Confirmación o tipificación
	Criterio	Criterio	Criterio
<b>eLOD<sub>50</sub></b>	Para protocolos 1 y 2: $eLOD_{50} \leq 4 \times LOD_{50}$  Para protocolo 3: $\geq 6$ de 7 resultados positivos	-----	-----
<b>Reproducibilidad intralaboratorio S<sub>IR</sub></b>	-----	$S_{IR} \leq 2 \times$ el más bajo valor medio $S_R^a$ determinado en el estudio de validación  $a = S_{IR} \leq 2 \times S_R$ para estudios de validación con sólo un valor de $S_R$	-----
<b>eBias</b>	-----	$ \log_{10} UFC/mL \text{ (inóculo)} - \text{el promedio } \log_{10}/ \text{porción de ensayo} $  (contaminado artificialmente el ítem (alimento))  $\leq 0,5 \log_{10}$ para cada nivel de inoculación	-----
<b>Inclusividad y exclusividad</b>	-----	-----	100% de concordancia entre métodos

Fuente: ISO 16140-3

Finalmente, la verificación de un método puede ser vista como una oportunidad de demostrar que efectivamente el método funciona de la manera adecuada cuando es ejecutado por el laboratorio que lo va a implementar, incluso para ítems (alimentos) no evaluados en la validación inicial.

Cuando la verificación del método (cualitativo o cuantitativo) no cumple con los requisitos establecidos en términos de su sensibilidad; medida como su nivel de detección 50 ( $eLOD_{50}$ ), de su precisión; medida a través de la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio, o de su veracidad; medida por su sesgo, se requiere hacer un análisis que permita establecer las causas que pueden estar ocasionando este comportamiento. Algunas de las que podrían estar asociadas a:

- **Personal: entrenamiento y conocimiento del ensayo**
- **Errores asociados a la estandarización del inóculo, de modo que el laboratorio alcance los niveles de contaminación lo más cercanos a los definidos en la planeación del ensayo.**

Una vez se han identificado las posibles causas del fallo, se sugiere repetir la verificación del método de referencia y, en lo posible, contrastarlo con un tercer método para definir si el alimento se comporta de la misma forma en los dos métodos.

Cuando la verificación “no cumple” con los requisitos establecidos, la norma recomienda que el laboratorio lo reporte al normalizador o al proveedor.







# COMENTARIOS




Finalmente, cabe recordar que el laboratorio cuando realice cambios de un método validado debe determinar la influencia de estos cambios y cuando éstos afecten la validación inicial, se debe realizar una nueva validación del método. Lo anterior es mandatorio porque evaluar el método es un proceso mediante el cual se da una información auténtica sobre un método analítico debidamente aplicado y/o suficiente para satisfacer las necesidades y estándares aceptables conforme sea el caso respecto a una validación o una verificación.

El equipo de analistas debe tener presente que trabajar con unidades formadoras de colonias (UFC) es complejo, porque las limitaciones están dadas principalmente por la enumeración sólo de aquellos microorganismos que crecen en el medio de cultivo sólido (células viables /cultivables), no obstante, estos métodos son el *gold standard* o los métodos de referencia (convencionales) que se utilizan de rutina en los ensayos microbiológicos. Por otro lado, al utilizar otra metodología de alta jerarquía metrológica para recuento de células en suspensión como se prevé, por ejemplo, la citometría de flujo, podemos obtener resultados más robustos en cuanto a precisión y exactitud, información del estado fisiológico del microorganismo, respuesta a antibióticos, interacción celular, por mencionar algunas aplicaciones aventajadas pero que también requieren una alta especialización del personal y equipos más costosos y sofisticados, donde se debe evaluar la necesidad y aplicabilidad de la adopción de un sistema de avanzada o un sistema tradicional que para efectos de utilidad proporcionan resultados confiables en la escala analítica respectiva.

Conforme a lo descrito en párrafo anterior, es importante destacar la interpretación de los resultados con base al objetivo del estudio





y su aplicabilidad. En este contexto, el analista debe tener claro los criterios de aceptabilidad y tener presente que en microbiología los valores absolutos son muy variables sobre todo cuando se trabaja con fase estacionaria, por lo que es recomendable considerar un margen o intervalo, en especial en las preparaciones de los inóculos, porque como se ha mencionado anteriormente, la variabilidad del recuento está sujeta a muchos factores (características propias del microorganismo, calidad de los medios de cultivos, dilución, condiciones de incubación, recuento propiamente tal, etc). También, considerar que trabajar con microorganismos esporulados (aerobios y anaerobios), hongos filamentosos y levaduras tiene un desafío adicional por sus características de crecimiento y condiciones de cultivo, principalmente.

Una de las claves de estos procesos de evaluación, en opinión de los autores, son la experiencia y estandarización del proceso (validación/ verificación) en el laboratorio, para lograr los objetivos establecidos y obtener resultados esperados conforme a lo planificado. En este aspecto, la disponibilidad de bibliografía oficial y en especial la serie de normas ISO 16140, son un gran soporte para la ejecución de los protocolos estandarizados que el laboratorio llevará a cabo para dar cumplimiento al requisito normativo 7.2 de la norma ISO 17025.

Esperamos haber cumplido con el objetivo de esta guía como una pauta de orientación útil en la materia descrita y en la disponibilidad de este documento técnico para los laboratorios de análisis en microbiología de los alimentos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. AOAC INTERNATIONAL. Appendix J : AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. in *Official Methods of Analysis of AOAC International*. (ed. Dr. George W. Latimer, J.) 1–21 (AOAC International, 2019).
2. International Organization for Standardization ISO. *ISO 16140-1 Vocabulario*. (2016).
3. International Organization for Standardization. ISO/IEC 17043 General requirements for proficiency testing. (2010).
4. AOAC INTERNATIONAL. Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. INTERLABORATORY COLLABORATIVE STUDY. in *OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS* (2005).
5. CEM Centro español de metrología. Vocabulario internacional de metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados. Tercera Edición. *Centro Español de Metrología* at <https://doi.org/10.1021/ja01341a021> (2012).
6. EURACHEM. *Eurachem Guide: Accreditation for Microbiological Laboratories*. (EURACHEM, 2013).
7. SENASICA Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria Gobierno de México. GUÍA DE VALIDACIÓN DE METODOS MICROBIOLÓGICOS. 1–14 at (2018).
8. U.S Food and Drug Administration FDA. Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Food and Feeds- Edition 3. 59 at <chrome-extension://efaidnbnmn-nibpcjpcglclefindmkaj/https://www.fda.gov/media/83812/download> (2019).
9. AOAC INTERNATIONAL. Appendix F : Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 18 at (2016).
10. Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas relacionados. Eurachem (2016).

11. International Organization for Standardization ISO. ISO 13843:2017 Water quality- Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods. 61 at (2017).
12. Scholer, D. The importance of traceability. *International Food Hygiene* vol. 22 25.
13. Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. Brock. *Biología de los microorganismos 12 ed.* (Editorial Pearson Prentice Hall Iberia, Madrid. Pp, 2015).
14. Uyttendaele, M. & Debevere, J. Validation of analytical methods used in food microbiology. in *Microbiological Analysis of Red Meat, Poultry and Eggs: A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* 276–304 (Woodhead Publishing Limited, 2006). doi:10.1533/9781845692513.276.
15. Singh, N. & Anand, S. B. T.-R. M. in F. S. Analytical Methods | Microbiological. in *Reference Module in Food Sciences* 1–8 (Elsevier, 2020). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.23005-9>.
16. ONAC Organismo Nacional de Acreditación. Acuerdos de Reconocimiento Internacional. <https://onac.org.co/acerca-de-onac/acuerdos-de-reconocimiento-internacional/>.
17. Camaró Sala, M. L., Catalá Cuenca, V., Gimeno Cardona, C., Martínez García, R. & Olmos Martínez, P. *Procedimientos De Microbiología Clínica - Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos.* (2013).
18. Gill, A. O. *Chapter 64 - Microbiological Analysis | Standard Methods. Encyclopedia of Meat Sciences* vol. 2 (Elsevier Ltd., 2014).
19. International Organization for Standardization ISO. ISO/IEC 17025 - *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.* (2017).
20. AOAC INTERNATIONAL. TECHNICAL COMMUNICATIONS AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. *J. AOAC Int.* 85, 1187–1200 (2002).

- 21.** International Organization for Standardization (ISO). ISO 7218:2007/Amd.1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations-Amendment 1. 2013, 66 (2013).
- 22.** Bari, M. L. & Yeasmin, S. Microbes Culture Methods. in *Encyclopedia of Infection and Immunity* 77–98 (Elsevier, 2022). doi:10.1016/b978-0-12-818731-9.00128-2.
- 23.** U.S Food and Drug Administration FDA. BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-appendix-2-most-probable-number-serial-dilutions> (2020).
- 24.** Tortorello, M. L. *Total Counts: Microscopy. Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* vol. 3 (Elsevier, 2014).
- 25.** Ortega González, M., Rodríguez Martínez, C. & Zhurbenko, R. Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas TT - Validation of alternative methods for the microbiological analysis of food products and water. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* 51, 111–121 (2013).
- 26.** EPA. Method Validation of U . S . Environmental Protection Agency ( EPA ) Microbiological Methods of Analysis Prepared for : The EPA Forum on Environmental Measurements ( FEM ). (2016).
- 27.** Okelo, P. O. Detection and enumeration of microbiological hazards in animal feed. in *Animal Feed Contamination: Effects on Livestock and Food Safety* 56–65 (Elsevier Ltd., 2012). doi:10.1533/9780857093615.1.56.
- 28.** Sandle, T. Rapid and Alternative Microbiological Methods. in *Biocontamination Control for Pharmaceuticals and Healthcare* (ed. Sandle, T.) 141–157 (ACADEMIC PRESS, INC., 2019). doi:10.1016/b978-0-12-814911-9.00009-2.
- 29.** Davey, H. M. Life, death, and in-between: Meanings and methods in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5571–5576 (2011).
- 30.** Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D. & Faucher, S. P. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 5, 1–1 (2014).

- 31.** International Organization for Standardization ISO. ISO 11133:2014 Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media. 94 at (2014).
- 32.** ICMSF.[Ottawa], I. C. on M. S. for F. Microorganismos de los Alimentos 1: Su significado y Métodos de Enumeración. *Editor. Acribia* (2002).
- 33.** U.S Food and Drug Administration FDA. BAM Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. 2021-11-16 <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>.
- 34.** Schottroff, F. *et al.* Sublethal injury and Viable but Non-culturable (VBNC) state in microorganisms during preservation of food and biological materials by non-thermal processes. *Front. Microbiol.* 9, 1–19 (2018).
- 35.** Downes, F. P. & Ito, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods—APHA. *Washington, DC. Ed 4,* (2001).
- 36.** Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica, Nieto, S. & Ramos, S. V. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. (2010).
- 37.** International Organization for Standardization ISO. ISO 16140-6. *Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures.* [www.iso.org](http://www.iso.org) (2019).
- 38.** Barwick, V. & Prichard, E. Eurachem Guide: *Terminology in Analytical Measurement - Introduction to VIM 3* (2011). *Guidance Document* (2011).
- 39.** International Organization for Standardization ISO. ISO Guide 33:2015 Reference materials — Good practice in using reference materials. (2015).
- 40.** ATCC. ATCC Bacteriology Culture Guide. <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/bacteriology-culture-guide#bacterialgrowth>.

41. ATCC. *Certified Reference Materials - ATCC. ATCC Tech Bulletin* (2019) doi:10.1007/978-3-662-09621-5\_15.
42. WFCC World Federation of Culture Collections. World Federation for Culture Collections. [https://wfcc.info/about\\_view](https://wfcc.info/about_view).
43. ILAC. *Policy on Metrological Traceability of Measurement Results. ILAC P10:07/2020 ILAC Policy on Metrological Traceability of Measurement Results* <https://ilac.org/?download=123220> (2020).
44. JRC European Commission. *CERTIFIED REFERENCE MATERIAL BCR ®-528 CERTIFICATE OF ANALYSIS*. <http://www.irmm.jrc.be> (2013).
45. International Organization for Standardization ISO. *ISO/Guide 35:2017(en) Reference materials — Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability*. (2015).
46. International Organization for Standardization ISO. *Guide 31. Reference materials, Contents of certificates and labels*. 14 at (2000).
47. International Organization for Standardization ISO. *GUIDE 80 First edition Guidance for the in-house preparation of quality control materials (QCMs) Lignes directrices pour la préparation interne des matériaux de référence utilisés pour le contrôle qualité Reference number ISO GUIDE 80:2014(E) COPYRIGHT PR.* (2014).
48. Laso Sánchez, J. Situación de la validación de los ensayos microbiológicos en los laboratorios. 569–575 (2005).
49. ICONTEC. *GTC 84 Calidad del agua. Guía para la orientación acerca de la validación de métodos microbiológicos*. 1–56 at (2003).
50. Organization, W. H. *Statistical aspects of microbiological criteria related to foods: A Risk Manager's Guide*. vol. 24 (Food & Agriculture Org., 2019).
51. Europe, I. Impact of microbial distributions on food safety. *ILSI Eur. Rep. Ser.* (2010).

52. Salfinger, Y. & Tortorello, M. Lou. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. (American Public Health Association, 2013). doi:doi:10.2105/MBEF.0222.
53. U.S Food and Drug Administration FDA. BAM Chapter 2: Microscopic Examination of Foods. 10/31/2017 <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-2-microscopic-examination-foods>.
54. Camaró-Sala, M. L. *et al.* Validation and verification of microbiology methods. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Monografías* vol. 33 e31–e36 at <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.010> (2015).
55. International Organization for Standardization ISO. ISO16140-3. Protocolo de verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados en un laboratorio. at (2021).
56. Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A. & Uyttendaele, M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol.* 27, 710–730 (2010).
57. Baird, R., Rice, E. & Eaton, A. Standard methods for the examination of water and wastewaters. *Water Environ. Fed. Chair Eugene W. Rice, Am. Public Heal. Assoc. Andrew D. Eaton, Am. Water Work. Assoc.* (2017).
58. Salinas-Rodríguez, A., Manrique-Espinoza, B. & Sosa-Rubí, S. G. Análisis estadístico para datos de conteo: Aplicaciones para el uso de los servicios de salud. *Salud Publica Mex.* 51, 397–406 (2009).
59. International Organization for Standardization ISO. ISO 16140-2. *Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.* [www.iso.org](http://www.iso.org) (2016).
60. USP, U. S. P. USP 43-NF 38. United States Pharmacopeial Convention. *Inc. Online version 7022* (2020).
61. Camaró-sala, M. L. *et al.* Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. 33, 31–36 (2015).
62. International Organization for Standardization ISO. *ISO 16140-4 Protocol for method validation in a single laboratory.* (2019).
63. Melo Martínez, O. O., López Pérez, L. A. & Melo Martínez, S. E. *Diseño de experimentos : métodos y*



aplicaciones. *Diseño de Experimentos Métodos y Aplicaciones* (Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias, 2020). doi:10.36385/FCBOG-4-0.

**64.** International Organization for Standardization ISO. ISO 16140-6 *Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures*. (2019).

**65.** VICTORIA STONE, P. D. American Society for Microbiology. asm.org <https://asm.org/Articles/2022/January/Planning-a-Method-Verification-Study-in-Clinical-M> (2022).

**66.** Hazeleger, W. C., Jacobs-Reitsma, W. F. & Den Besten, H. M. W. Level of Detection (LOD50) of *Campylobacter* Is Strongly Dependent on Strain, Enrichment Broth, and Food Matrix. *Front. Microbiol.* 13, (2022).

**67.** NMKL Nordic-Baltic Committee on Food Analysis. NMKL . Verification of microbiological methods. Procedure 32. <https://www.nmkl.org/product/verification-of-microbiological-methods/> (2018).

**68.** Uhlig, S. & Gowik, P. Efficient estimation of the limit of detection and the relative limit of detection along with their reproducibility in the validation of qualitative microbiological methods by means of generalized linear mixed models. *J. Consum. Prot. Food Saf.* 13, 79–87 (2018).





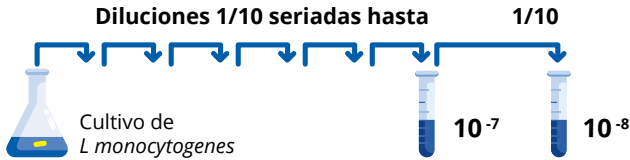
# ANEXOS

---



## Verificación método de detección de *L. monocytogenes* y *Listeria spp.* ISO 11290-1

### 1. Inóculo



Concentración inicial es  $12 \times 10^8$  UFC/mL

Se asume que esta concentración va a ser constante en las mismas condiciones de cultivo (ISO 16140-3). Siempre confirmar con recuento o NMP la concentración.

### 2. LOD<sub>50</sub> estimado (eLOD<sub>50</sub>)

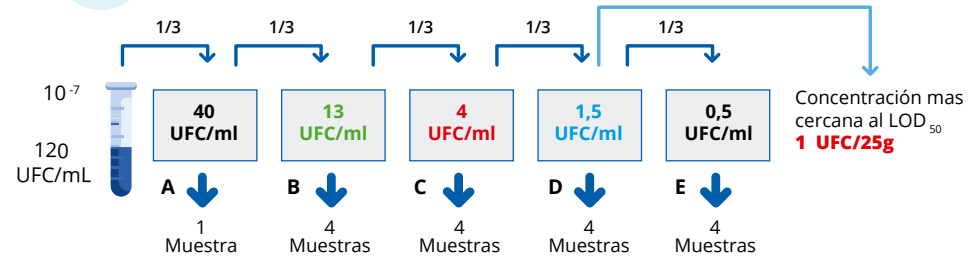
Reporte LOD<sub>50</sub> de la validación  
Anexo F ISO 11290-1  
**1 UFC/25mL o g Minced meat, milk products**

### 3. Protocolo de verificación de implementación y de alimento

Características de desempeño	Verificación de implementación	Verificación de alimento
LOD <sub>50</sub> estimado (eLOD <sub>50</sub> )	Si	Si

Protocolo de verificación de LOD <sub>50</sub> y número de replicados por cada nivel de contaminación					
Protocolo 1	9 x LOD <sub>50</sub> alta	3 x LOD <sub>50</sub> media	1 x LOD <sub>50</sub> baja	Blanco	Total
Número de muestras mínimo	1	4	4	4	10
Valor del LOD <sub>50</sub> de ISO 11290 en Milk Products	9 UFC/25g	3 UFC/25g	1 UFC/25g	0 UFC	

### 4. Adición de *L. monocytogenes*



\* Este ejemplo usa mas del número mínimo de diluciones sugeridas en el protocolo 1 para alcanzar el LOD<sub>50</sub>. Usar muestras de queso (milk products). Total de muestras necesarias: 17 para inocular y 1 de blanco (18 muestras en total)

	Muestra A 9 x LOD <sub>50</sub> alta	Muestra B 9 x LOD <sub>50</sub> alta	Muestra C 3 x LOD <sub>50</sub> media	Muestra D 3 x LOD <sub>50</sub> baja	Muestra E 1 x LOD <sub>50</sub> baja	Blanco
Resultados positivos	---	1/1	2/4	1/4	---	0

Son las tres diluciones relevantes mas cercanas al nivel del LOD<sub>50</sub>

	9 x LOD <sub>50</sub>	3 x LOD <sub>50</sub>	1 x LOD <sub>50</sub>	
Tabla 6 de ISO 16140-3	1	2	1	2,6 x 0,5 = 1,3 eLOD <sub>50</sub>

### 5. Criterio de aceptación

$$eLOD_{50} < 4 \times LOD_{50}$$



Verificación de implementación:  
comparar LOD<sub>50</sub> Milk Products vs eLOD<sub>50</sub>

1 UFC/25g vs 1,3 UFC/25g



Verificación de alimento:  
eLOD<sub>50</sub> no puede ser mayor que 4 veces  
el LOD<sub>50</sub> Milk Products

1,3 UFC/25g < 4 UFC/25g

Método verificado, cumple con el criterio de aceptación y el desempeño adecuado para el fin previsto en el laboratorio

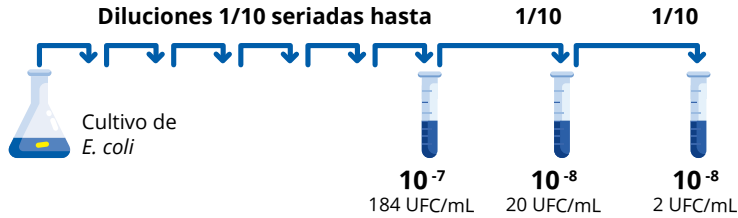


# Verificación método de enumeración de microorganismos ISO 4833-1

## VERIFICACIÓN DE IMPLEMENTACIÓN



### 1. Inóculo

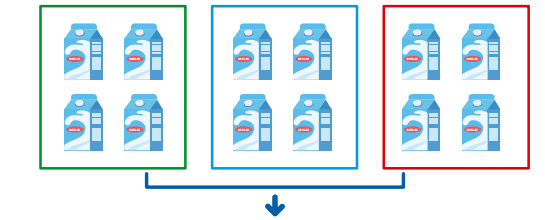
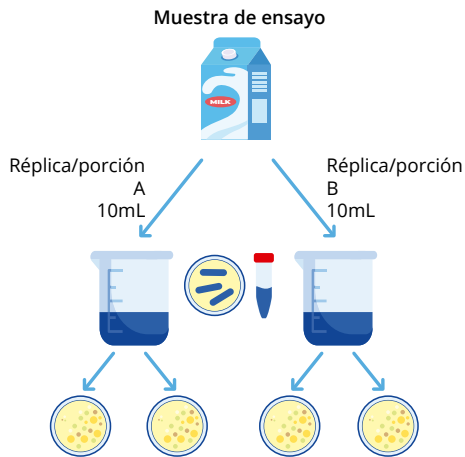


**Concentración inicial es  $2 \times 10^9$  UFC/mL**

Se asume que esta concentración va a ser constante en las mismas condiciones de cultivo (ISO 16140-3). Siempre confirmar con recuento o NMP la concentración.

### 2. Muestras

- 1- Escoger una muestra de las categorías de alimentos validadas
- 2- De esa muestra prepare mínimo 10 muestras de ensayo
- 3- Inocule con diferentes niveles de contaminación, según el intervalo que va a cubrir  
Ejemplo: 20.000 UFC/mL a 20 UFC/mL
- 4- Analice cada muestra como indica la figura:



12 muestras de leche pasteurizada, diferentes marcas  
3 niveles de contaminación que cubren en intervalo escogido

**Alta:** 30.000 UFC/mL **Media:** 100 UFC/mL **Baja:** 20 UFC/mL

### 3. Resultados

Tabular los resultados de los recuentos y tener en cuenta el máximo número de conteos por cada caja de Petri. ISO 4833 reporta mínimo 15 UFC y máximo 300 UFC

# de muestra	Concentración esperada	A	B	Log10 A	Log10 B	Concentración esperada   Log10A - Log10B	Cuadrado de las diferencias   Log10A - Log10B
1	20000	17000	21000	4.23045	4.32222	0.09177	0.008421801
2	2000	1800	2100	3.25527	3.32222	0.06695	0.004481873
3	2000	1900	2500	3.27875	3.39794	0.11919	0.0142054
4	2000	1600	2000	3.20412	3.30103	0.09691	0.009391551
5	2000	1700	2200	3.23045	3.34242	0.11197	0.012538123
6	2000	1900	1600	3.27875	3.20412	0.07463	0.005570177
7	200	110	193	2.04139	2.28556	0.24416	0.059616364
8	200	290	180	2.46240	2.25527	0.20713	0.04290097
9	200	150	170	2.17609	2.23045	0.05436	0.002954755
10	200	230	210	2.36173	2.32222	0.03951	0.001560925
11	20	30	10	1.47712	1.00000	0.47712	0.227644692
12	20	20	0	1.30	No se usa	No se usa	No se usa
suma							0.38928663
Suma/2x11							0.017694847
$S_{IR}$							<b>0.133021979</b>

### 4. Evaluación de los resultados

Desviación estándar de reproducibilidad intra-laboratorio. Ver figura 6, EC 3

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{IA} - y_{IB})^2}$$

- NOTA**
- Si el método que verifica solo reporta un  $S_{IR}$  comparar con ese valor el  $S_{IR}$  calculado.
  - Si reporta varios  $S_{IR}$  comparar con el  $S_{IR}$  mas bajo reportado.

Calcular el  $S_{IR}$  y compararlo con el  $S_{IR}$  del método ISO 4833-1.

**Criterio de aceptación es:**  
 $S_{IR}$  calculado menor o igual a  $2 \times S_{IR}$  del estudio de validación

$$S_{IR} : 0.13 \leq \frac{S_{IR} \text{ del método ISO 4833-1: } 0.25}{0.25 \times 2 = 0.5}$$

**El límite de aceptación para la verificación de implementación se cumple.**



# Verificación método de enumeración de microorganismos ISO 4833-1

## ESTIMACIÓN DEL SESGO



### 1. Inóculo

#### Concentración inicial es 2 x 10<sup>9</sup> UFC/mL

Se asume que esta concentración va a ser constante en las mismas condiciones de cultivo (ISO 16140-3). Siempre confirmar con recuento o NMP la concentración.

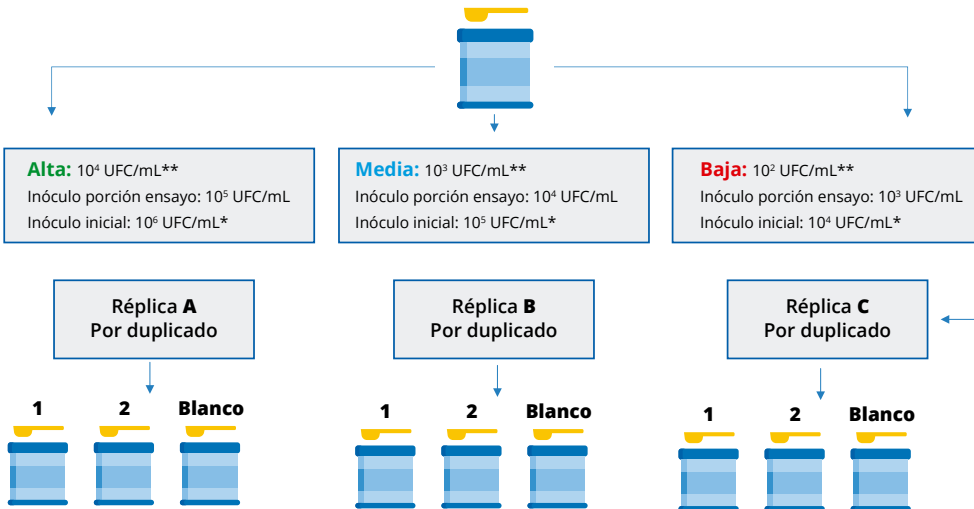
### 2. Muestras de alimentos

Escoger al menos 1 tipo de alimento, de las categorías validadas (o definidas en el alcance del laboratorio que lo va usar). Preferiblemente desafiante técnicamente.

#### Diseño

Más detalles ver figura 7, EC 4.

Tipo de alimento seleccionado  
**Leche en polvo**



\* Siempre confirmar la concentración del inóculo que va a ser adicionado usando el método que esta siendo verificado, ISO 4833-1.

\*\* Recuento de UFC en la muestra .

### 3. Resultados

Se evalúan los resultados, expresados como la diferencia absoluta entre la concentración del inóculo usado y la concentración en la muestra artificialmente contaminada en unidades de Log<sub>10</sub> de UFC

	A	B	C
Inóculo inicial	Alto 10 <sup>6</sup>	Medio 10 <sup>5</sup>	Bajo 10 <sup>4</sup>
Recuento de Inóculo inicial	2300000	180000	13000
Log <sub>10</sub> inóculo inicial	6,362	5,255	4,114
Inoculo/porcion de ensayo	230000	18000	1300
<b>Log<sub>10</sub> inóculo porción ensayo</b>	<b>5,362</b>	<b>4,255</b>	<b>3,114</b>
Recuento UFC 1	23000	1870	190
Recuento UFC 2	18700	1930	170
Log <sub>10</sub> recuento1	4,3617	3,2718	2,2788
Log <sub>10</sub> recuento 2	4,2718	3,2856	2,2304
Promedio Log <sub>10</sub> recuentos	4,3168	3,2787	2,2546
<b>Log<sub>10</sub> recuentos UFC/porción de ensayo (10g)</b>	<b>5,31</b>	<b>4,27</b>	<b>3,25</b>
diferencia/ sesgo estimado	0,052	0,015	0,136

Se prepara así:  
10 g de muestra con 90mL de diluyente escogido.

$$sesgo = b = x - x_{ref} \quad EC 4$$

Criterio de aceptación es:

El sesgo estimado debe ser menor o igual a 0.5 Log<sub>10</sub> de UFC del valor de referencia

El método verificado funciona correctamente para el uso en el laboratorio



# Hoja de cálculo de ISO para verificación de métodos ISO 16140-3: 2021 versión original



Descargar: <https://bit.ly/40wsjtZ>

# Hoja de cálculo de ISO para verificación de métodos ISO 16140-3: 2021 versión español



**Nota:** Si presenta dificultad con la descarga de los documentos, copie el enlace y péguelo en el navegador de internet de su preferencia, para realizar la descarga del documento.

Descargar: <https://bit.ly/3siiiH9w>