"Requisitos y aspectos prácticos para validar y aplicar métodos alternativos en el laboratorio de microbiología"

David Tomás Fornés
dtomas@ainia.es

1.- INTRODUCCIÓN

El empleo de métodos alternativos supone considerables ventajas frente a los métodos convencionales o de referencia, como son la rapidez, automatización, interpretación de resultados, etc. No obstante, pueden darse situaciones que limitan su uso en determinadas condiciones o presentan limitaciones que deben ser evaluadas en cada caso particular, debiendo demostrarse que estos métodos permiten obtener resultados equivalentes al método de referencia y que presenta ventajas frente al mismo.

Estos métodos alternativos para el análisis microbiológico de alimentos ya es en la actualidad una realidad siendo ampliamente empleados tanto por laboratorios de autocontrol como en laboratorios de control oficial de alimentos.

No obstante, no solo es de interés para las empresas y laboratorios de control el empleo de métodos alternativos en el ámbito del cumplimiento de criterios de seguridad alimentaria y de higiene de los procesos, sino que en muchas ocasiones es necesario también garantizar criterios relacionados con la conservación y estabilidad de los alimentos, de forma que se pueda disponer de forma rápida de información acerca de la potencial presencia de microorganismos alterantes que pueden provocar importante pérdidas económicas, en cuyo caso también el empleo de métodos rápidos y automatizados es de gran interés y la comprobación de que este método es válido para el uso previsto es más importante si cabe, puesto que en este caso es frecuente que exista una gran diversidad de microorganismos alterantes y de matrices en las que detectarlos

2.- ASPECTOS PREVIOS RELATIVOS A LA VALIDEZ DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS

La norma UNE-EN ISO/IEC 17025 en su apartado 5.4.2 establece que "*El laboratorio debe utilizar métodos de ensayo que satisfagan las necesidades del cliente y sean apropiados para el uso previsto*".

Por tanto, debe tenerse en cuenta el ámbito de aplicación, tanto por el laboratorio en cuanto a la selección de los procedimientos de ensayo y su validación, como por el organismo de acreditación en las evaluaciones que realice.

Además, la norma establece que "*cuando el cliente no especifique el método a utilizar, el laboratorio debe seleccionar los métodos apropiados que hayan sido publicados en normas internacionales, regionales o nacionales, por organizaciones técnicas reconocidas o en libros o revistas científicas especializados o especificados por el fabricante de equipos*".(ENAC. NT-32 rev. 2 julio 2010 http://www.enac.es/web/enac/documentos-descarga)

Así pues y en primer lugar, y antes de empezar con las experiencias prácticas de implantación del método alternativo, es necesario verificar la adecuación al uso del mismo, para lo que debemos recopilar toda la información disponible, tanto relativa a los datos disponibles sobre la caracterización del método, como aquellos incluidos en la ficha técnica que nos proporcione el fabricante del método (en el caso de kits o métodos comerciales) o en el artículo o método normalizado que vayamos a emplear.

Aspectos importantes que nunca debemos obviar para garantizar la adecuación del método son:

- Plazo de obtención de resultados (con y sin confirmaciones)
- Matrices objeto de análisis (limitaciones, preparación especial de determinadas muestras...)
- Inversión en equipamiento
- Cualificación del personal (interpretación de resultados, manipulación...)
- Infraestructuras de laboratorio
- Validación o reconocimiento por organismos nacionales o internacionales
- Y por supuesto... el coste por ensayo (reactivos, personal...)

Una vez identificados todos estos aspectos, podemos pasar a revisar con más detalle los datos relativos a la validación del mismo, así como la información técnica disponible en literatura científica. Este último aspecto es importante tanto en el caso de los kits (puesto que nos puede dar una visión independiente del funcionamiento del mismo) como en relación con su aplicación e implantación en determinados laboratorios de referencia.

Desde un punto de vista práctico, en relación con los métodos alternativos el laboratorio se enfrenta básicamente con dos posibilidades:

- **Métodos comerciales** o "kits"
- **Métodos públicos**, como por ejemplo los disponibles en literatura científica o los desarrollados por Laboratorios de Referencia.

Según se recoge en la Norma ISO 17025:2005 que establece los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, (punto 5.4.5.2): *"se deben validar los métodos no normalizados, los métodos diseñados/desarrollados internamente, los métodos normalizados utilizados fuera de su campo de aplicación previsto y las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados con el fin de comprobar que son apropiados para el uso previsto".*

Por tanto y en ambos casos, a efectos del reconocimiento de la validez técnica del método de ensayo por parte de terceros (ejm. organismos de acreditación) es necesario disponer de datos de validación acorde a un esquema internacionalmente reconocido, bien siguiendo el esquema de la Norma ISO 16140 - Protocolo para validación de métodos alternativos, bien en el documento "Guidelines for validation of Microbiological Methods of analysis" publicado por AOAC.

En general y en ambos casos, los parámetros que se deben obtener para considerar una validación completa (ver punto 3) son:

MÉTODOS CUALITATIVOS	MÉTODOS CUANTITATIVOS
• Eficacia relativa	• Linealidad y exactitud relativa
• Sensibilidad relativa	• Límites de detección y cuantificación
• Especificidad relativa	• Sensibilidad relativa
• Nivel de detección relativa	• Especificidad y selectividad
• Inclusividad y exclusividad	• Reproducibilidad y repetibilidad

En ambos casos, una validación completa requiere de la organización de estudios interlaboratorios. Este aspecto podría obviarse determinados casos en los que el método solo va a ser empleado por un único laboratorio o las técnicas empleadas no son de uso común por parte de un número significativo de laboratorios.

Cualquier aspecto de la validación del método que no haya sido contemplado en la validación inicial del método tendrá que ser complementado debidamente por el laboratorio que vaya a emplear el mismo. NO SE PUEDE MODIFICAR EL MÉTODO

Por otra parte, tomando al pié de la letra el contenido del Reglamento en vigor relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Reglamento (CE) nº 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005, DOCE L 338 22/12/05) se recoge en su considerando 24 que *"los resultados de las pruebas dependen de los métodos analíticos utilizados y, por lo tanto, cada criterio microbiológico debe asociarse a un método de referencia determinado"* pero indica claramente que *"los explotadores de las empresas alimentarias pueden usar métodos analíticos diferentes a los métodos de referencia, en particular métodos más rápidos, siempre que estos métodos alternativos produzcan resultados equivalentes"*

Así pues desde un punto de vista legal se reconoce el empleo de este tipo de métodos en el ámbito de la legislación actual, si bien posteriormente incluye en el artículo 5 punto 5 que *"Se autorizará el uso de métodos alternativos cuando los métodos estén validados con respecto al método de referencia establecido en el Anexo I y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos similares internacionalmente aceptados."* En la práctica, la legislación indica la exigencia de validar el método en cualquier caso, pero solo es necesario que esté certificado en el caso de los "métodos comerciales" o kits y no en el caso de los métodos públicos.

Por último, indicar que también se refleja que *"si el explotador de la empresa alimentaria desea utilizar métodos analíticos distintos a los validados y certificados tal y como se ha descrito en el párrafo anterior, los métodos deben validarse conforme a protocolos internacionalmente aceptados y su uso deberá ser autorizado por la autoridad competente"*. Es decir, de nuevo tenemos la necesidad de validar estos métodos, aunque cabe la posibilidad de emplear métodos no certificados, si la autoridad competente lo autoriza y por tanto su uso queda restringido al ámbito de actuación que tenga fijado las autoridades sanitarias.

En cualquier de los casos anteriores, y suponiendo que el método alternativo está validado de forma correcta (esté o no certificado) el laboratorio siempre debe "confirmar que puede aplicar correctamente los métodos antes de utilizarlos para los ensayos".

3.- VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO (NORMA UNE-EN ISO 16140:2003)

La **Validación inicial o completa**, requiere de una importante puesta a punto previa del método de ensayo (ver fig 1) y supone un protocolo extenso que utiliza un diseño de experiencias y unos criterios de evaluación de resultados preestablecidos y reconocidos internacionalmente (como por ejemplo los recogidos en la Norma UNE EN ISO 16140:2003)

Fruto de esta validación se pueden obtener valores que posteriormente pueden ser empleados para la comprobación o verificación (punto 4) del método

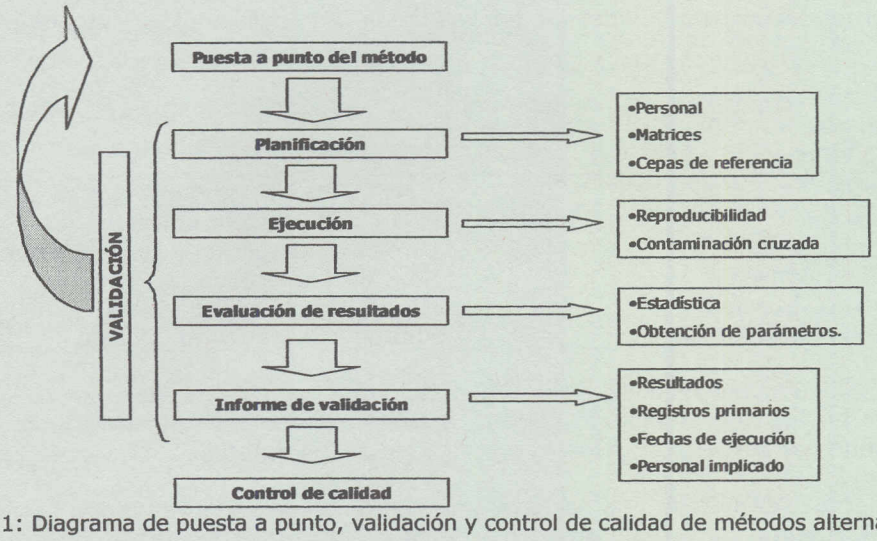

Fig. 1: Diagrama de puesta a punto, validación y control de calidad de métodos alternativos

Así pues, el protocolo de validación consiste en dos etapas:

- **Estudio comparativo** entre el método alternativo y el método de referencia realizado por un **laboratorio experto**
- **Estudio interlaboratorio** en el que se emplean y comparan los resultados obtenidos por los dos métodos.

3.1.- Matrices objeto de estudio

La norma ISO 16140 contempla el tipo de matrices que deben evaluarse para la validación de un método microbiológico:

En el caso de alimentos, se deben estudiar 5 categorías de alimentos. Este número puede reducirse si el método se aplica a un ámbito restringido. (Puede consultarse en Anexo B de la Norma UNE-EN ISO 16140:2003):

Carnes y producto cárnicos	Pescados y mariscos
Aves de corral	Frutas y verduras
Productos lácteos	Chocolate/productos panadería
Otros productos (especias, salsas, huevos, pa cereales, bebidas)	Alimentación animal

3.2.- Validación de métodos cualitativos:

En primer lugar se realiza un estudio comparativo por parte del laboratorio experto que consiste en la caracterización del método con el siguiente procedimiento:

Se deben analizar al menos 60 muestras por cada método y categoría de alimentos, las cuales, idealmente, debe estar contaminadas en una proporción del 50%.

A partir de los resultados obtenidos con ambos métodos se construye la siguiente tabla:

RESPUESTA	VALOR REF POSITIVO (R+)	VALOR REF. NEGATIVO (R-)
MÉTODO A VALIDAR POSITIVO (A+)	+/+ CONCORDANCIA POSITIVA (PA)	-/+ DESVIACIÓN POSITIVA (PD)
MÉTODO A VALIDAR NEGATIVO (A-)	+/- DESVIACIÓN NEGATIVA (ND)	-/- CONCORDANCIA NEGATIVA (NA)

Eficacia relativa (AC): Grado de concordancia entre la respuesta obtenida por el método a validar y el valor verdadero obtenido en muestras idénticas

$$AC = \frac{(PA + NA)}{(NA + PA + PD + ND)} x100$$

Desviación positiva (PD): Se produce cuando el método a validar da un resultado positivo y el valor de referencia es negativo. Una desviación positiva se convierte en una **falso positivo** cuando se puede demostrar que el resultado verdadero es negativo.

Desviación negativa (ND): Se produce cuando el método a validar da un resultado negativo y el valor de referencia es positivo. Una desviación positiva se convierte en una **falso negativo** cuando se puede demostrar que el resultado verdadero es positivo.

Sensibilidad relativa (SE): Capacidad del método a validar de detectar el microorganismo cuando está presente en la muestra a analizar o no diferir de manera significativa del valor de referencia (<30%)

$$SE = \frac{PA}{(PA + ND)} x100$$

Especificidad relativa (SP): Capacidad del método a validar para no detectar el analito cuando no es detectado por el método de referencia.

$$SP = \frac{NA}{(NA + PD)} x100$$

Nivel de detección relativa (LOD): Menor número de microorganismos que puede detectarse en una muestra

Se seleccionan diferentes matrices que deben contener tres niveles de contaminación (blanco, próximo al limite de detección y por encima del mismo (ejm. 3xLOD) Para su evaluación es necesario obtener una recuperación parcial en al menos uno de los niveles. Es por ello que generalmente se habla de LOD 50 de forma que se compara un método frente a otro.

Inclusividad: Capacidad para detectar el analito entre un amplio grupo (50) de cepas diana

Exclusividad: Ausencia de interferencia en el método de un grupo (30) de cepas no diana

Posteriormente (o de forma paralela) se realiza un estudio intercomparativo, en el que se debe contar con 10 laboratorios participantes y 3 niveles mínimos de contaminación y 8 replicados por cada nivel de contaminación, lo que supone un total de 480 resultados (240 por cada método)

3.3.- Validación de métodos cuantitativos:

Igual que anteriormente se desarrolla en primer lugar un estudio de caracterización por parte del laboratorio experto:

Se trabaja con 5 concentraciones del analito en cada tipo de alimento para establecer una curva de calibración, de forma que se cubra el intervalo completo, realizando al menos 10 mediciones (idealmente 25-50) con muestras contaminadas naturalmente por el método alternativo.

De nuevo se estudian 5 categorías de alimentos y de cada muestra se replica entre 2 y 10 veces para lograr de 10 a 50 resultados por método y categoría de alimentos.

Estos datos se representan de forma gráfica (ver fig 2) empleando el eje Y para el método alternativo y el eje x para el de referencia, evaluando la existencia de datos anormales.

A partir de los mismos se hace un estudio de regresión (Y=a+bx) en el que no solo debemos evaluar el coeficiente de correlación (r.) sino que se debe verificar que las hipótesis a=0 y b=1 se cumplen (ejm.: los valores de la recta están dentro de un intervalo de confianza del 95%) evaluando de este modo la linealidad o defecto de ajuste (Aptitud del método para dar resultados que están en proporción con la cantidad de microorganismos presentes en la muestra), así como la precisión de los métodos (límites en los que la exactitud especificada se encuentra con una probabilidad del 95%)

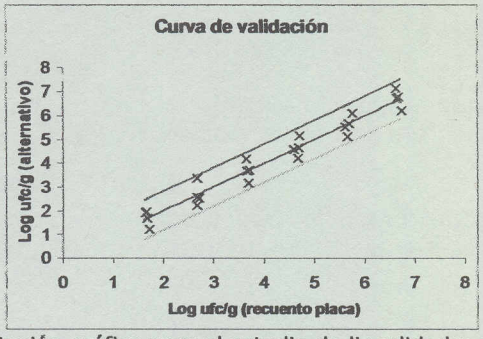

Fig. 2: Representación gráfica para el estudio de linealidad y exactitud relativa

Posteriormente se estiman los Límites de detección y cuantificación a través del nivel crítico (menor cantidad que puede ser detectada (no nula) pero no cuantificada como un valor exacto. Para ello se seleccionan tres niveles de microorganismos (mínimo, medio y alto) y se replica cada uno de los niveles al menos 6 veces, a partir de cuyos datos se establece el nivel crítico, el LOD y LOQ. Como dato importante, indicar que la AOAC define el LOQ como aquella en el que el coeficiente de variación (S/X) debe ser inferior al 10%.

Del mismo modo debe determinarse la sensibilidad para los diferentes intervalos de medida, la especificidad y selectividad de modo similar a lo realizado en los métodos cualitativos.

Por último, también es necesario realizar un estudio interlaboratorios en el que participen 8 laboratorios en los que se debe estimar la exactitud y precisión del método sobre 3 niveles de microorganismos, lo que implica un mínimo de 96 resultados válidos de la matriz alimenticia escogida, donde se obtienen respectivamente la repetibilidad, precisión y sesgo del método alternativo.

3.4.- Nuevas estrategias en el desarrollo de normas de validación

En relación con los nuevos métodos de validación, indicar que en 2011 se ha publicado una corrección de la ISO 16140:2003 que afecta básicamente a aspectos relacionados con la realización de ejercicios intercomparativos para validar métodos cuantitativos.

Por otra parte, se están desarrollando diversas normas (Se espera disponer de un borrador público o DIS en julio de 2012) que contemplarán:

- Norma 16140-1: Recoge todo lo relacionado con definiciones y terminología

- Norma 16140-2: Validación de métodos comerciales o kits, que mantiene la estructura de la actual ISO 16140, explicada anteriormente pero se introduce algunos cambios, sobre todo en lo referente a métodos cuantitativos donde se contempla un diseño de experimentos diferente, como se refleja en la figura 4:

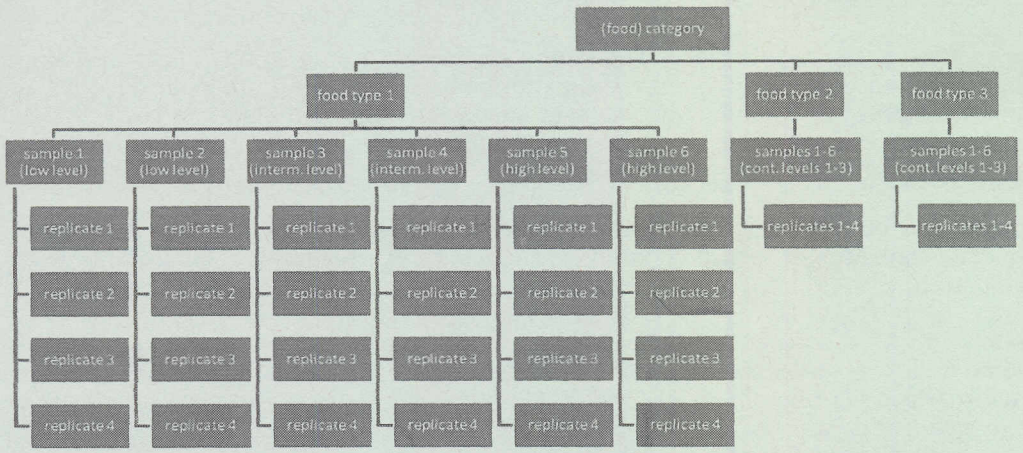

Fig. 4: Diagrama del diseño experimental para una categoría de alimentos asumiendo 3 niveles de contaminación

Así mismo, los métodos cuantiativos se estudian mediante un nuevo estudio estadístico, de modo que el enfoque es mucho más ajustado al rendimiento esperado del método con respeto al método de referencia.

El gráfico que permite evaluar este método puede resumirse en la figura 5:

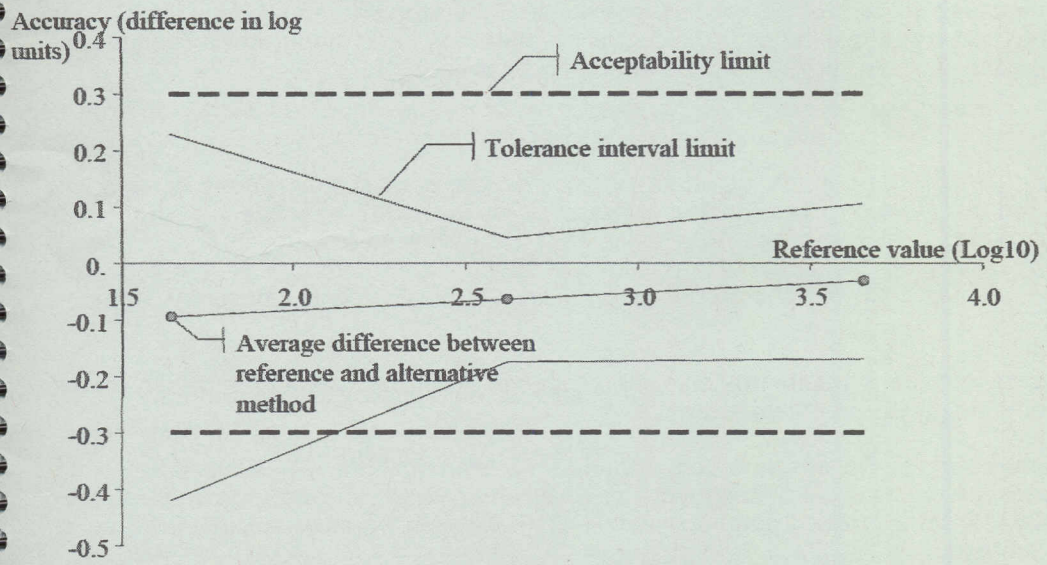

Fig 5: Presentación general del perfil de exactitud y precisión para la validación de un método alternativo (el límite de aceptabilidad se ha seleccionado arbitrariamente)

También se está desarrollando un nuevo método (ISO 17468) donde se describe la metodología necesaria para validar métodos de referencia (documento que solo será empleado para organismos de normalización)

Por último y como novedad importante, también se va a desarrollar una norma que sirva de guía para la correcta verificación o comprobación de métodos por parte de los laboratorios usuarios, si bien en este momento está en fase de definición y no se han desarrollado contenidos técnicos.

4.- VERIFICACIÓN O COMPROBACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE UN MÉTODO ALTERNATIVO

La validación interna o verificación por parte del laboratorio de control que va a utilizar el método alternativo, que consiste básicamente en comprobar que el laboratorio es capaz de cumplir con los requisitos de funcionamiento del método previamente establecidos en las condiciones habituales de trabajo.

Lo primero que debemos conocer antes de incorporar un método alternativo, como se ha indicado en el punto 2, es si el mismo ha sido validado de forma completa con un esquema internacionalmente reconocido (por ejemplo con la sistemática establecida anteriormente) o si por el contrario esta validación no es completa, en cuyo caso el laboratorio es responsable de obtener (en literatura científica o realizado las experiencias pertinentes) evidencias suficientes para complementar las carencias que pueda presentar dicha validación.

Del mismo modo, es importante que el laboratorio utilice el método alternativo tal y como ha sido diseñado por el fabricante, puesto que en caso contrario no se puede garantizar la validez del mismo, y el laboratorio deberá realizar una validación completa (ver punto 3).

La comprobación es más importante si cabe en los métodos alternativos puesto que en muchos casos se reconoce que el rendimiento de estos métodos puede verse afectado por diferentes microorganismos, como viene reflejado en algunos protocolos de métodos alternativos *"El parámetro xxxxx ha sido evaluado sobre numerosos productos . Sin embargo, teniendo en cuenta la diversidad de productos y procesos de fabricación, se recomienda verificar que la composición de las matrices analizadas no afecta a la fiabilidad de los resultados"*

Existen muchas alternativas para realizar la verificación de métodos alternativos y como se ha indicado anteriormente, desde el punto de vista normativo no existe todavía un documento de referencia en el que basarse.

No obstante, los enfoques más habituales consisten en la realización de muestras por duplicado (analizadas en paralelo por el método de referencia y por el método alternativo) o el empleo de materiales de referencia con un valor conocido.

Aunque desde un punto de vista ortodoxo no se deben emitir resultados analíticos antes de realizar una comprobación, es comúnmente aceptado, sobre todo en el caso de método ampliamente reconocidos y que disponen de una validación el realizar este tipo de verificaciones mediante el control de calidad interno del laboratorio (empleando para ello un esquema similar al descrito en este punto) así como resultados procedentes de ejercicios intercomparativos (aunque en este último caso el tipo de matrices a analizar no suele ser representativo de muestras reales)

3.1.- Matrices a emplear:

Nunca debemos olvidar que esta comprobación tiene como objetivo **demostrarnos a nosotros mismos que, en condiciones reales de ejecución de los ensayos, los resultados que voy a emitir son correctos** y por tanto no tiene ningún sentido emplear microorganismos o matrices que no reflejen la realidad del método de ensayo. En este sentido, la esterilización de matrices está claramente desaconsejada puesto que se aleja enormemente de la realidad en los análisis de rutina (como excepción podemos citar los laboratorios que analicen exclusivamente conservas o platos preparados tratados térmicamente)

Para una verificación de un método que se emplee en alimentos en general, deben verificarse alimentos de diferentes categorías (ver punto 3.1) y tipos, así como de diversas procedencias.

El número de categorías a verificar ideal es de 5. No obstante, es razonable realizar una primera evaluación en un número limitado de categorías representativas de las que habitualmente se analicen en el laboratorio y posteriormente, mediante las pruebas de control de calidad interno, ir incorporando nuevas matrices para verificar su influencia en el resultado y las posibles limitaciones del método.

Una vez identificadas el tipo y número de matrices a emplear procederemos de forma diferente en función del tipo de método que queramos verificar

Así pues el diseño de la verificación del método debe establecerse de tal modo que se garantice de la forma más fiel posible las condiciones de uso habituales del método. Para ello lo ideal es trabajar con matrices naturalmente contaminadas que contengan el microorganismo objeto de análisis. Solo en caso de no disponer de las mismas es posible emplear la inoculación artificial.

3.2.- Inoculación de microorganismos diana/interfirientes

En el caso de que se requiera de una contaminación artificial, (dada la ausencia de materiales de referencia microbiológicos que incorporen el efecto matriz) se pueden emplear cepas procedentes de Colecciones de Cultivos Tipo (www.cect.org) a partir de las que prepararemos la suspensión de inóculo o También pueden utilizarse material de referencia certificado con una concentración y pureza conocida comercializado en diversos formatos por diferentes organismos y empresas (Health Protection Agency "http://www.hpa.org.uk/", LABAQUA http://www.labaqua.com/ o MicroBiologics "http://www.microbiologics.com/)

El empleo de cepas salvajes o de muestras procedentes de intercomparativos como material de referencia es también posible, siempre que estos microorganismos estén perfectamente caracterizados y se pueda asegurar que cumplen con los requisitos de estabilidad, pureza, viabilidad y comportamiento adecuado al fin buscado.

3.3.- Métodos cualitativos:

El **objetivo** de la verificación es comprobar que podemos **detectar un nivel suficientemente bajo de microorganismos en las diferentes matrices** objeto de análisis.

No es razonable que el laboratorio de análisis deba estimar el límite de detección que previamente ha sido estimado en la validación, sino más bien evaluar la influencia de las condiciones reales (matrices, analistas, medios de cultivo...) en la capacidad de detección de microorganismos diana a bajos niveles.

En ls validaciones completas se estima el nivel de detección relativo mediante la inoculación de diferentes niveles, siendo el limite de detección en aquel nivel donde se obtiene un número parcial de resultados positivos del total de muestras inoculadas y posteriormente se emplean test estadísticos como el Test Fisher para métodos cualitativos o Ley de Poisson para métodos cuantitativos (Tabla P.1 UNE EN ISO 16140), lo cual no suele ser posible en los laboratorios de rutina.

Por otra parte, la estimación del límite de detección requiere del empleo de suspensiones de inóculo con niveles de concentración bajos que deben ser preparadas por el laboratorio, puesto que en la actualidad no existe un material de referencia disponible a estos niveles.

El propio intervalo de confianza a estos bajos niveles (ver tabla 1) hace que, desde un punto de vista estadístico, no se pueda conocer de forma exacta si un determinado inóculo contiene o no el microorganismo a detectar, por lo que un laboratorio de control generalmente no dispone de la suficiente experiencia y recursos para abordar la tarea de conseguir un inóculo con una concentración lo suficientemente baja como para estimar el límite de detección.

En su lugar es más adecuado el empleo de material de referencia con bajas concentraciones (ejm. de ne torno a 10 ufc/muestra y siempre inferiores a 25 ufc/muestra) o la preparación de inóculos con una concentración tal (por ejemplo no más de 10 veces el limite de detección) que el laboratorio pueda garantizar su valor y evaluar diferencias entre las distintas matrices, analistas, etc, de forma que en lugar de estimar el límite de detección se verifica la capacidad del laboratorio de obtener resultados reproducibles y eficaces con bajos niveles de microorganismos diana.

Número de colonias	Intervalo de confianza (95%)	
	Inferior	Superior
1	<1	2
2	<1	4
3	<1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12

Número de colonias	Intervalo de confianza (95%)	
	Inferior	Superior
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21

Tabla 1: Intervalos de confianza para bajos niveles de colonias en placa

Así pues y dado que, no deseamos calcular el límite de detección (aspecto que ya ha debido ser evaluado anteriormente en la validación completa del método) la verificación en los métodos cualitativos puede hacerse con niveles en los que el **microorganismo diana** se encuentre en valores de entre **4 y 16 ufc/muestra**, de forma que se garantiza que en el inóculo disponemos de entre 1 y 25 ufc/muestra (con un límite de confianza al 95% para recuentos con bajos números

de colonias) garantizando que la muestra ha sido efectivamente inoculada con **al menos 1 microorganismo y no más de 25.**

Con estos niveles de inóculo deben inocularse al menos **6 muestras diferentes** (idealmente 10) por categoría de alimentos en condiciones de reproducibilidad, obteniendo en todos los casos valores positivos. De este modo, se puede considerar verificado un método de uso general en alimentos, si obtenemos **resultados positivos en el análisis de al menos 30 muestras de 5 categorias de alimentos**. Las muestras empleadas pueden ser muestras de las que habitualmente reciba el laboratorio, de modo que mediante su análisis habitual se pueda verificar la ausencia del microorganismo diana en las mismas. En caso contrario deberán realizarse análisis complementarios para verificar la ausencia del mismo.

En algunos casos y siempre que esté debidamente justificado, pueden emplearse niveles más altos de inóculos para verificar un método, pero en estos casos se recomienda revisar si la capacidad del método es la adecuada (ejm. LOD de los certificados de validación) y en caso de no disponerlos, realizar los análisis de las muestras inoculadas mediante dos métodos diferentes (método de referencia y alternativo) de modo que podamos evidenciar si el problema es del método que empleamos, o bien de una determinada cepa o por el contrario del laboratorio.

3.4.- Métodos cuantitativos

En este tipo de métodos debemos estimar:

Recuperación puede ser estimada mediante la exactitud (grado de concordancia entre un resultado de un análisis y el valor de referencia aceptado) o el sesgo (diferencia entre el resultado esperado y el valor de referencia aceptado.

La exactitud, cuando se aplica a un conjunto de análisis, incorpora combinación de resultados aleatorios y el error sistemático común, que es el que estimamos a través del sesgo.

El término exactitud es complementario al de eficacia o veracidad. Dado que en microbiología no es posible en la práctica obtener un valor de referencia, deberemos emplear en su caso el término relativo, puesto que el valor de referencia se obtiene mediante el propio análisis de la muestra con un método de referencia aceptado.

Reproducibilidad, o precisión intermedia, considernado este término en realidad como el de reproducibilidad interlaboratorios, es decir, el grado de concordancia entre resultados de análisis individuales empleando el mismo método obtenido en las condiciones más diversas que se puedan dar en el laboratorio (operadores diferentes, lotes de reactivos diferentes, equipos diferentes...)

Desde un punto de vista práctico es aconsejable realizar la verificación de la recuperación y la reproducibilidad simultáneamente, mediante el análisis por duplicado de muestras con una concentración conocida. En este caso, es aconsejable que las muestras contemplen diferentes niveles de contaminación y que estos permitan realizar un recuento dentro del rango habitual de lectura (ejm en el caso de placas petri de 90 mm recuentos de entre 15 y 150 o 30 y 300 colonias) no siendo incluidos en el cálculo los casos en los que los recuentos son inferiores a 10 colonias (como recuento total en todas las placas)

El diseño de experiencias podría ser el siguiente:

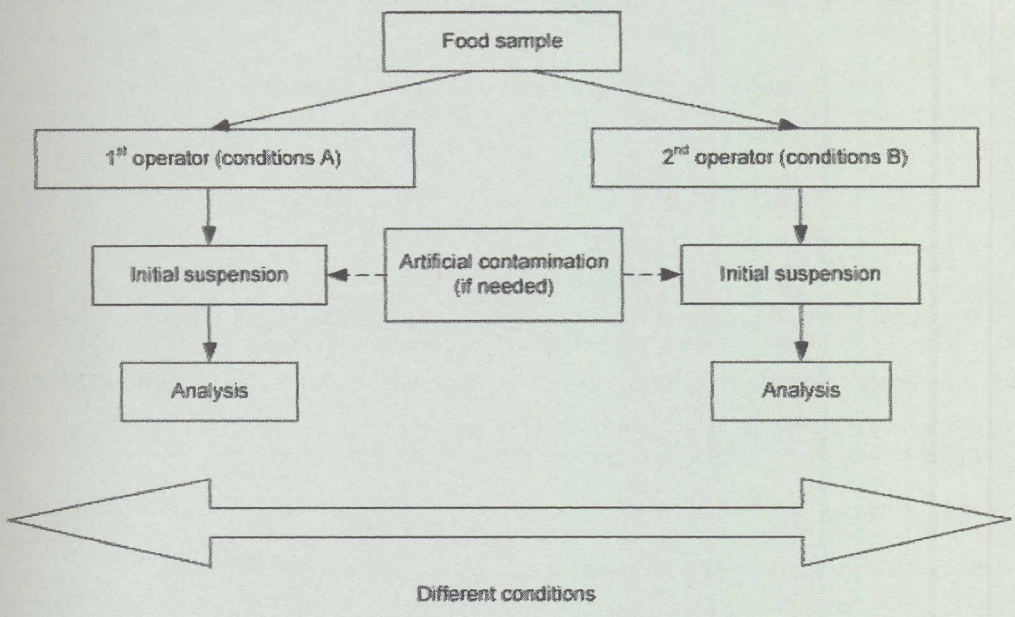

Fig. 6: Esquema de realización de duplicados para estimar la incertidumbre del método.(ISO/TS 19036:2006)

Generalmente se realizan entre 5 y 10 muestras (ver ISO 19036) de diferentes categorías (entre 3 y 5) representativas del alcance, debiendo contemplarse para un alcance de alimento en general entre 25 y 30 muestras por duplicado.

Para la estimación de la **tasa de recuperación** se puede evaluar cada recuento individualmente como:

$$Rec = \frac{X_i}{Y_i}$$

Siendo:

X_i = Recuento del método a comprobar en ufc/g

Y_i = Valor de referencia en ufc/g

Estos valores se expresa en valor logaritmico y posteriormente el valor de recuperación se pueden comparar con los valores de referencia indicados en la norma ISO 11133-2 Anexo B. Los valores que habitualmente se estiman adecuados son Rec ≥ 0,5 en métodos que incluyen el empleo de medios selectivos y Rec ≥ 0,7 para aquellos en los que se emplean medios no selectivos.

También podemos realizar otras aproximaciones para evaluar la exactitud al objeto de estimar diferencias entre el valor de referencia de diferentes poblaciones (muestras) mediante empleo de criterios estadísticos como al t student o la realización de ANOVA si los datos así lo permiten.

No obstante este enfoque está siendo cuestionado dado que pueden producirse casos en los que se aprecien diferencias estadísticamente significativas que indican que la exactitud de un método no es la adecuada y sin embargo desde el punto de vista microbiológico, dicho método es válido e incluso mejor que otros, como se puede observar en la siguiente figura:

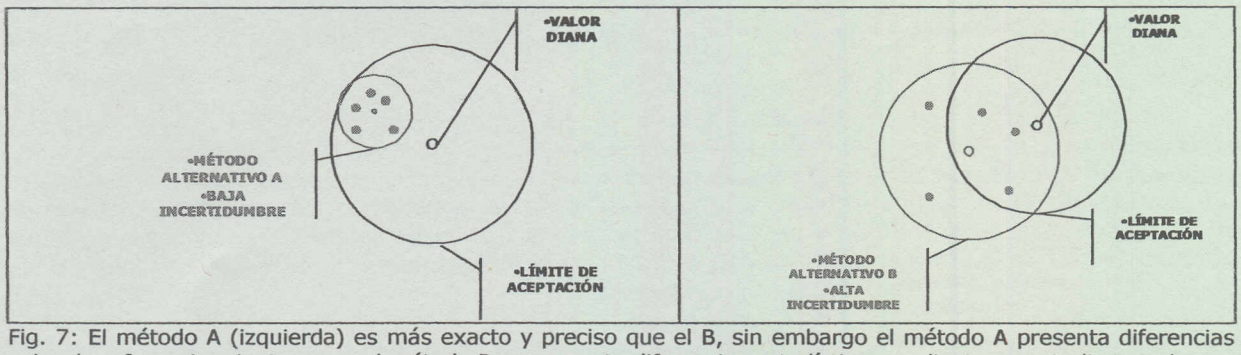

Fig. 7: El método A (izquierda) es más exacto y preciso que el B, sin embargo el método A presenta diferencias estadísticas, frente al valor de referencia mientras que el método B no presenta diferencias estadísticas mediante un estudio t student o ANOVA

EN cuanto a la reproducibilidad (así como la estimación de la incertidumbre) a partir de los resultados obtenidos de las muestras analizadas por duplicado obtenidas en varias matrices (fig 6), se realizarán los siguientes cálculos.

a) Transformar los valores ufc/g en valor logarítmico

b) Calcular la media de los duplicados de cada muestra según la fórmula:

$$\overline{y_i} = \frac{y_{iA} + y_{iB}}{2}$$

c) Calcula la varianza de la reproducibilidad (S_{Ri}^2) para cada muestra, según:

$$s_{R_i}^2 = \left(y_{iA} - \overline{y_i}\right)^2 + \left(y_{iB} - \overline{y_i}\right)^2 = \frac{\left(y_{iA} - y_{iB}\right)^2}{2}$$

d) Calcular la desviación estándar de la reproducibilidad (s_R) según:

$$s_R = \sqrt{\sum_{i=1}^{n} \frac{s_{R_i}^2}{n}} = \sqrt{\sum_{i=1}^{n} \frac{\left(y_{iA} - y_{iB}\right)^2}{2n}}$$

e) Calcular la incertidumbre U

La modificación de la norma ISO 19036:2006, Amd. 1:2009, considera el cálculo de la incertidumbre expandida (U), asumiendo que el número de colonias en placa sigue una distribución de Poisson y permite obtener la incertidumbre en casos donde se obtiene recuentos bajos (aunque la suma de colonias en todas las placas debe ser al menos >10). La incertidumbre expandida se calcula con la siguiente fórmula:

$$U = 2\sqrt{s_R^2 + \frac{0{,}188\,61}{\sum C}}$$

Donde $\sum C$ es la suma de colonias que se cuentan en todas las placas que se han utilizado para el análisis.

Cuando esta formula se aplica en los casos que se hayan obtenido ensayos con un número de colonias total elevado, el segundo término puede considerarse despreciable y calcular la incertidumbre como: $U=2S_R$.

A partir la integración de todos los resultados de recuento expresados en ufc/g, se estimará la Desviación Estandar de Reproducibilidad (S_R) y este dato permite calcular la Reproducibilidad intermedia (R) según la fórmula:

$$R = 2\sqrt{2}S_R = 2.82 * S_R$$

El valor de S_R y R (o Sr y r) obtenido debe ser inferior al valor de referencia disponible en la norma o, en caso de ausencia, aquellos publicados en artículos científicos o guías de carácter horizontal (ejm. 19036).

Como ejemplo algunos de los datos disponibles para comparar la obtenida en nuestro laboratorio:

Ensayo	**Repetibilidad**	**Reproducibilidad**	**Referencia**
Aerobios mesófilos	r=0,25	R=0,45	ISO 4833
Coliformes totales	Sr = 0.20	S_R=0.5	ISO 4832
E. coli	Sr = 0.11	S_R=0.47	ISO 19036
Mohos y levaduras	Sr = 0.29	S_R=0.75	ISO 19036
Enterobacteriaceae	Sr = 0.04	S_R=0.52	ISO 19036
S. aureus	r=0.28	R=0.43	ISO 6888-1
B. cereus	r=0.29	R=0.42	ISO 7932-2

También podemos comparar estos valores con los proporcionados por los **certificados de validación del método alternativo.** No obstante, en estos casos, el valor de reproducibilidad se estima a partir de un ejercicio colaborativo, por lo que en su estimación se han considerado los datos de múltiples laboratorios con diferentes analistas, equipos, mayor número de muestras lo que en general implica una mayor hetereogeneidad y la suma de contribuciones que no van a darse en un único laboratorio.

Es por ello que el valor de reproducibilidad obtenido puede ser muy elevado en relación con el valor obtenido en la verificación. En este caso se recomienda tomar como criterio en lugar del R (reproducibilidad interlaboratorios) el valor de referencia identificado como r (repetibilidad intralaboratorio) que es más semejante a las condiciones experimentales que se dan en este tipo de verificaciones.

3.5.- Control de calidad interno

La Norma UNE-EN ISO 17025:2005 (punto 5.9) indica que el laboratorio debe tener procedimientos de control de calidad para realizar el seguimiento de la validez de los ensayos (...)

El control de calidad debe realizarse de tal forma que permita detectar tendencias y aplicar técnicas estadísticas para la revisión de los resultados. Además, el control de calidad interno puede permitir obtener información que indique si métodos son apropiados para el tipo y volumen de trabajo que se realiza de forma cotidiana en el laboratorio.

Los datos debe ser analizados y si no satisfacen los criterios predefinidos se deben tomar acciones planificadas para corregir el problema y evitar los resultados incorrectos.

Estos criterios, si bien pueden obtenerse a partir de los datos propios de la validación del método es más coherente **emplear los valores reales obtenidos a partir de las pruebas de verificación** o comprobación del método para asegurar la correcta evaluación de los mismos.

4.- MÉTODOS ALTERNATIVOS CERTIFICADOS.

Como se ha indicado anteriormente, en algunos casos (empleo de métodos comerciales o "kits") la legislación recoge la necesidad de que el método alternativo haya sido certificado por terceros.

En la actualidad, y a nivel mundial solo existen 3 organismos que certifican la validez de métodos alternativos:

- AFNOR VALIDATION (http://www.afnor-validation.org/)
- MICROVAL (http://www.microval.org/)
- AOAC RI(http://www.aoac.org/)

Las dos primeras organizaciones emplean como norma para validar la ISO 16140:2003, mientras que AOAC, emplea criterios propios pero armonizados con la ISO 16140 (http://www.aoac.org/Official_Methods/Food_Micro_Validation_Guidelines.pdf), aunque en su organización hay diferentes niveles de exigencia para los métodos alternativos.

La certificación de un método permite, además de garantizar la validez del método, asegurar que el fabricante del método alternativo disponga de un sistema de calidad para la producción del kit (ejm. ISO 9001) así como la certificadora debe realizar una verificación regular de los métodos y evaluar cualquier modificación del producto o del proceso de producción para ver si estas modificaciones afectan a la validación del kit.

Además, la certificadora suele evaluar un gran número de aspectos complementarios a la norma de validación, como las ventajas del método, su aplicabilidad, facilidad de uso etc...

Al objeto de hacer un resumen de el número y tipología de métodos alternativos disponibles bajo un esquema certificado, se muestran la siguiente tabla:

	Certificadora		
Microorganismo	**AFNOR**	**MicroVAL**	**AOAC**
Salmonella	28	4	29
Listeria spp	15	-	18
Listeria monocytogene	25	1	10
E. coli O157	9	-	23
Cronobacter	1	2	-
Campylobacter	2	2	3

En cuanto a las diferentes tecnologías empleadas para la validación de métodos, y tomando como ejemplo los métodos alternativos empleados para la detección de Salmonella spp., las diferentes técnicas empleadas pueden agruparse en el siguiente tabla

Tecnología	**AOAC**	**AFNOR**
Inmunoenzimática	10	14
Genética	16	9
cultivo	3	5

5.- CONCLUSIONES

El empleo de métodos alternativos es una posibilidad técnicamente válida y reconocida tanto por los organismos de acreditación como por la legislación vigente.

El laboratorio debe utilizar métodos de ensayo que satisfagan las necesidades del cliente y sean apropiados para el uso previsto.

Una vez seleccionado el método alternativo que cubre con nuestras necesidades y se adecua al uso previsto, el laboratorio comprobar que el método se ha validado y si procede certificado en el caso de kits comerciales (punto 3) así como confirmar o verificar que lo ha implantado adecuadamente y es capaz de obtener resultados válidos en las condiciones reales de ensayo (punto 4)

El empleo de métodos validados y certificados aporta además la garantía por parte de terceros de otros aspectos complementarios como los relacionados con la producción y revisión periódica de los métodos de ensayo.