Claves para acreditar una técnica de PCR.
Caso práctico: Salmonella spp. en leche y productos lácteos.

M. Galbany[1] y M. Lázaro[2].
[1] Responsable del Departamento de Calidad del Laboratorio Interprofesional Lechero de Catalunya (ALLIC).
[2] Responsable del Departamento de Microbiología del Laboratorio Interprofesional Lechero de Catalunya (ALLIC). micro@allic.org

Resumen:

La validación del protocolo para la detección de *Salmonella spp* por la técnica de la PCR y su posterior comprobación mediante los controles de aseguramiento de la calidad, nos ha permitido obtener la acreditación en una técnica que ofrece la posibilidad a nuestros clientes de obtener resultados en poco tiempo.

Introducción

El laboratorio interprofesional lechero de Catalunya, especializado en el análisis de leche y productos lácteos, está acreditado por ENAC para la determinación de diferentes tipos de análisis tanto químicos como microbiológicos. La acreditación por ENAC es el reconocimiento formal de que un organismo es competente para llevar a cabo tareas específicas de análisis.

Si no se especifica lo contrario, la selección de los métodos adecuados para nuestros clientes la realizamos tal y como está reflejado en el *Reglamento (CE) nº 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimentarios* (y modificaciones posteriores), dónde figuran los métodos oficiales.

Tipo de método a validar

Entendemos como validación la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

Según la *NT-32 Análisis microbiológico: documento aclaratorio*(1) (ENAC), la extensión de las actividades de validación dependerá del tipo de método seleccionado, diferenciando:

- Tipo I: Métodos normalizados.
- Tipo II: Métodos alternativos
- Tipo III: Métodos basados en métodos de referencia
- Tipo IV: Otros métodos

Desde el año 2001 nuestro laboratorio está acreditado para la determinación de *Salmonella spp* según un método el tipo III: métodos basados en métodos de referencia. Este tipo no precisa de una validación completa, pero se deben realizar las comprobaciones pertinentes para asegurar su buen funcionamiento.

A lo largo de este año nos planteamos la puesta apunto de la determinación de *Samonella spp.* por la técnica de la PCR. Este método de análisis es considerado en el proceso de validación como Método alternativo –Tipo II, es decir, un método que ha sido validado por comparación con el

método de referencia que corresponda, de acuerdo a un estándar aceptado (ej: ISO 16140[2], etc.) y reconocidos por la comunidad científica y tecnológica como equivalentes al método de referencia.

En nuestro caso el protocolo iQ-Check para la detección de *Salmonella* II por PCR está validado por comparación con el método de referencia para *Samonella spp* ISO 6579[3], de acuerdo a la norma ISO 16140 [2] y reconocido por AFNOR (certificado: BRD 07/06-07/04: *Etude de validation de la méthode iQ-Check ™ Salmonella* II *selon la référentiel* ISO 16140 – *Validation* AFNOR[4]).

Por tanto, cumple los requisitos para considerarse Tipo II: Método alternativo y, a efectos de validación, debe ser tratado como un método de referencia.

Características de la validación

Debido a que el método es cualitativo, nuestro objetivo es comprobar si hay presencia o ausencia de *Salmonella spp* en una determinada cantidad de muestra. La validación se basará en la determinación del **límite de detección,** que consiste en el inóculo de una suspensión del microorganismo diana (Salmonella *spp*) a baja concentración en una matriz.

Así mismo se evaluaran diferentes matrices y analistas con el objetivo de verificar la capacidad del laboratorio para obtener resultados reproducibles y eficaces a bajas concentraciones de *Salmonella spp*.

Matrices

El ensayo de validación incluirá diferentes tipos de matrices como así lo indica la NT-32[1]: *el laboratorio debe justificar la selección y tipo de matrices en función del alcance de acreditación y ésta basarse en la información tomada de referencias bibliográficas o estándares internacionales (...)*. En el Anexo B de la norma UNE-EN ISO 16140[2] se especifica que para la determinación de *Samonella spp* en productos lácteos debemos tomar como matrices productos crudos, congelados, desecados y fermentados.

Métodos

- **Elaboración de los PNTEs.**

  Se realizaron dos nuevos PNTEs específicos:

  - PNTE: **Detección de Salmonella spp por la técnica de la PCR**

    Documentos utilizados:
    - ISO-UNE- EN ISO 22119 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para la detección de patógenos en los alimentos[5].
    - UNE-EN ISO 22174 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos [6].
    - Protocolo del kit iQ-Check Salmonella Easy II[7].

  - PNTE: **Calibración y mantenimiento del termociclador**

    Documentos utilizados:
    - MxPro QPCR *Software Instrucction Manual for Mx3000P and Mx3005P QPCR Systems Software version 4* [8]

El resto de procedimientos que están implicados en el método a validar, ya se tenían redactados y solo se realizaron pequeñas modificaciones (ej.: limpieza y desinfección del laboratorio).

Calibración de los equipos:

Se realiza la calibración de todos aquellos equipos relacionados directamente con el método a validar. En el caso del termociclador se realiza una validación del equipo con una placa de control interno específica del fabricante del equipo; se controla el número de horas de la lámpara del termociclador y se realiza una calibración de las temperaturas del equipo.

Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo

El aseguramiento de la calidad se realiza de forma interna y externa.

Controles internos

Control de las condiciones de trabajo: se realizan un blanco en cada serie de trabajo que demuestran la esterilidad de los medios y materiales utilizados. El blanco se considera una muestra más en el proceso de extracción de ADN y amplificación.

Controles en el proceso de amplificación:

- Control interno de amplificación: cada muestra amplificada contiene un control interno de amplificación (IAC) que nos permite saber si el proceso de amplificación ha sido correcto en función del resultado final de la muestra.
- Control negativo de amplificación: en cada serie de muestras amplificadas se añade un control negativo que nos permite demostrar que los reactivos/material de amplificación no están contaminados.
- Control positivo de amplificación: en cada serie de muestras amplificadas se añade un control positivo de amplificación que permitirá comprobar la eficacia de los reactivos utilizados en el proceso de amplificación.

Controles externos (intercomparaciones)

Se participa en ensayos colaborativos organizado por el organismo: Actalia Cecalait especializado en productos lácteos, obteniéndose resultados dentro de los criterios de aceptación del ensayo.

Límite de detección

- Muestras naturales inoculadas:
  Para cada matriz se realizan un mínimo de 10 muestras inoculadas con *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*.
  La concentración de ufc total es <10 ufc en 25 gramos de muestra.
  Las muestras inoculadas se procesan paralelamente por la técnica de la PCR según el protocol iQ-Check Samonella II[7] (método alternativo) y por el método que ya tenemos acreditado para la detección de salmonella en alimentos basado en la ISO 6579[3].

- Muestras naturales sin inóculo
  Paralelamente se realizan blancos de las muestras sin inóculo para verificar por ambos métodos que las muestras seleccionadas no contienen Salmonella spp.

Con estos ensayos se pretende comprobar las posibles interferencias de las matrices en la detección de *Salmonellas spp* a bajas concentraciones.

Resultados y conclusiones

Tanto las matrices utilizadas en el proceso de validación como las muestras aleatorias dieron resultados que coincidían con la metodología seguida en la ISO, demostrando así, que no han habido inhibiciones por parte de las matrices.

Como ventajas en la metodología utilizada por PCR, destacamos la rapidez: resultados negativos en 48 horas; la especificidad: en muestras muy contaminadas con flora interferente se evita dar falsos negativos y comodidad: reducción del manejo de tubos y placas.

Como inconveniente destacar que ante un resultado positivo por PCR a *Salmonella spp*, se debe confirmar por la metodología basada en la ISO.

Ante la posibilidad de resultados no coincidentes (positivo por PCR y negativo por ISO), se opta la repetición de la muestra y revisión de ambos procesos. Si el resultado no coincidente se repite, se decide dar la muestra como negativa ya que el método oficial es aquel basado en la ISO.

Bibliografía

[1]NT-32 de ENAC Análisis microbiológico: Documento aclaratorio (Rev. 3 Abril 2012)
[2]ISO 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative methods
[3]Norma ISO/DIS 6579 (2002): Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of Samonella spp.
[4]Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse. Application à la microbiologie alimentaire, Rapport de synthèse: Etude de validation de la méthode iQ-Check™ Salmonella II selon le réféntiel ISO 16140. Méthode qualitative.
[5]ISO-UNE- EN ISO 22119 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para la detección de patógenos en los alimentos
[6]UNE-EN ISO 22174 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos
[7]Protocolo del kit iQ-Check Salmonella Easy II
[8]MxPRo QPCR Software Instruccction Manual for Mx3000P and MX3005P QPCR Systems Software version 4.