

PROCESOS DE VALIDACIÓN Y CERTIFICACIÓN UNE EN ISO 16140 PARA MÉTODOS RÁPIDOS DE MICROBIOLOGÍA

Pablo de Vicente López (AENOR, Madrid) pdevicente@aenor.com

1. Introducción
2. Esquema de validación
3. Definición del alcance
4. Validación de métodos cualitativos
5. Validación de métodos cuantitativos
6. Certificación

1. Introducción

El campo de los análisis microbiológicos ha experimentado un gran desarrollo en las últimas décadas, los avances en biotecnología, la automatización y la microelectrónica han conllevado el desarrollo de un gran número de métodos de análisis, proponiendo enfoques diferentes para la detección y cuantificación de microorganismos en alimentos. Estos métodos son rápidos y más sencillos de realizar que los métodos tradicionales descritos en las diferentes Normas.

Estos nuevos métodos de ensayos se denominan métodos alternativos, y presentan, como su propio nombre indica, una alternativa a los métodos tradicionales o de referencia (normativos) que se vienen empleando desde hace muchos años en los laboratorios de microbiología.

Tanto la administración como las entidades de acreditación reconocen y permiten el uso de los métodos alternativos, pero en ambos casos exigen que estos métodos cuenten con una validación y certificación basada en la norma UNE EN ISO 16140, *"Microbiología de la Cadena Alimentaria. Validación de métodos."* u otra similar reconocida internacionalmente. La validación surge por la necesidad de verificar que con el empleo de métodos alternativos obtenemos resultados equivalentes a los obtenidos por los métodos de referencia o normativos.

2. Esquema de validación de métodos alternativos

El proceso de validación de métodos alternativos se estructura en dos fases:

- a) Estudio comparativo: en esta fase el laboratorio se compara el método alternativo frente al método de referencia. El estudio comparativo lo lleva a cabo el laboratorio responsable de realizar y planificar toda la validación, denominado en la norma laboratorio organizador. El número y tipo de muestras a analizar va a depender del alcance de la validación.
- b) Estudio interlaboratorio. Una vez verificado que el método alternativo es equivalente al método de referencia de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio comparativo es necesario comprobar que estos resultados se pueden replicar en otros laboratorios.

Existe una tercera fase, no recogida en la norma como tal, sería la certificación del método. En esta fase una entidad de certificación evalúa los resultados obtenidos en la validación y audita al fabricante del método alternativo, concediendo el certificado correspondiente si procede.

3. Definición del alcance

Previamente a comenzar con el proceso de validación es necesario definir el alcance de la misma, ya que va a determinar los estudios a realizar, así como el tipo y número de muestras analizar.

Aspectos a definir:

- a) Tipo de método: cualitativo o cuantitativo.
- b) Método de referencia frente al cuál se va a comparar el método alternativo. El método de referencia debe ser un método normativo reconocido a nivel internacional que haya sido ampliamente validado.
- c) Alcance de la validación, la norma UNE EN ISO 16140 recoge las diferentes categorías de alimentos que se deben analizar para cada microorganismo. En el caso de que el alcance de la validación incluya determinados alimentos sólo se evaluarán las categorías a las que pertenezcan. Si el alcance de la validación es para alimentos en general deberán evaluarse al menos 5 categorías de alimentos.
La norma también determina la variedad de alimentos que deben ensayarse en cada una de las categorías, así en el Anexo A de la norma divide cada categoría en diferentes tipos de alimentos, siendo necesario testar los diferentes tipos dentro del estudio.
- d) Tipo de estudio: en el caso de los métodos cualitativos se deberá determinar si los estudios son pareados o no:
 - a. Pareado: los métodos de referencia y alternativo comparten la misma porción de muestra.
 - b. No pareado: los métodos de referencia y alternativo se inician con diferentes porciones de muestra.

El tipo de estudio vendrá determinado por los pasos iniciales del método alternativo, y va a influir en la realización de los estudios de validación así como en los cálculos de los Límites de Aceptación (AL).

4. Validación de métodos cualitativos.

4.1 Estudio comparativo.

a) Estudio de sensibilidad:

La sensibilidad es la capacidad de un método para detectar el analito objeto de la validación. El propósito del estudio es determinar la diferencia de sensibilidad entre el método de referencia y el método alternativo.

El estudio se realizará en las categorías de alimentos determinadas en función del alcance previsto de la validación. Para cada una de las categorías de alimentos se analizarán al menos 60 muestras por ambos métodos, presentando al menos 30 de ellas un resultado positivo por uno de los dos métodos.

Los resultados obtenidos se evaluarán de la siguiente forma:

PA: Concordancia positiva, el resultado en los dos métodos ha sido positivo.

NA: Concordancia negativa, el resultado en los dos métodos ha sido negativo.

PD: Desviación positiva, el resultado por el método de referencia ha sido negativo, y positivo por el método alternativo.

ND: Desviación negativa, el resultado por el método de referencia ha sido positivo, y negativo por el método alternativo.

Los datos se presentarán de acuerdo con la siguiente tabla cruzada para cada categoría:

CATEGORIA A	Metodo Ref (R+)		Metodo Ref (R-)	
	Nº muestras	PA	Nº muestras	PD
Metodo alter. positivo (A+)	Nº muestras	PA	Nº muestras	PD
Metodo alter. negativo (A-)	Nº muestras	ND	Nº muestras	NA

Con los datos obtenidos se calcularán los siguientes valores

- Sensibilidad del método de referencia.
- Sensibilidad del método alternativo.
- Veracidad relativa, es el grado de equivalencia entre los resultados obtenidos por el método alternativo y el método de referencia.
- Proporción de falsos positivos del método alternativo.
- Valor para determinar el cumplimiento del AL (Límite de aceptabilidad), en caso de que el valor calculado supere el AL establecido en la norma se considerará que ambos métodos no son equivalentes.

b) Estudio del nivel de detección relativa (RLOD):

La finalidad del estudio es evaluar el Nivel de detección relativa a $P=0,50$ (LOD50) del método alternativo frente al nivel de detección a $P=0,50$ (LOD50) del método de referencia.

El LOD50 es la capacidad de un método para detectar determinada concentración de analito el 50% de las veces.

El estudio se llevará a cabo en cada una de las categorías de alimentos incluidas en el estudio de sensibilidad, utilizando una sola matriz que represente a toda la categoría.

Las muestras se inocularán artificialmente, preparándose al menos tres niveles de contaminación para cada categoría:

- Nivel de control negativo, en el caso de obtener un resultado positivo por alguno de los dos métodos en este nivel se deberá repetir el estudio.
- Nivel bajo: corresponderá al nivel de detección teórico, y deberá devolver entre un 25% y un 75% de resultados positivos.
- Nivel alto: será justo por encima del nivel de detección teórico.

El RLOD vendrá determinado por la siguiente fórmula:

$$RLOD = \frac{LOD_{alt}}{LOD_{ref}}$$

Dentro de cada categoría se estimarán además los RLODs mediante un modelo de ajuste complementario log-log.

c) Inclusividad y exclusividad

Inclusividad: estudio que supone la detección o recuento de cepas objeto del estudio puras mediante el método alternativo.

Exclusividad: estudio que implica a cepas no objeto de estudio puras que pueden presentar potencialmente una reacción cruzada pero que no se espera detectar mediante el método alternativo.

Las cepas en ambos casos deberán seleccionarse siguiendo las pautas del Anexo E de la norma. En el caso de los ensayos de inclusividad se analizarán al menos 50 cultivos puros diferentes, salvo en el caso de *Salmonella* que se analizarán un mínimo de 100. Para evaluar la exclusividad se analizarán como mínimo 30 cultivos puros de posibles microorganismos interferentes.

4.2 Estudio interlaboratorio

El objetivo del estudio interlaboratorio es determinar la variabilidad de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios analizando muestras idénticas y comparar dichos resultados con el global del estudio comparativo realizado.

De acuerdo con la norma UNE EN ISO 16140-2:2006 el estudio interlaboratorio debe producir un mínimo de 10 laboratorios colaboradores con resultados no discrepantes.

Para llevar a cabo el interlaboratorio se seleccionará un solo tipo de alimento seleccionado entre todas las categorías que se han evaluado en el estudio comparativo.

Se prepararán las muestras con tres niveles de contaminación:

- Control negativo.
- Nivel bajo, este nivel debe producir resultados positivos y negativos. Para determinar este nivel se tendrán en cuenta los resultados obtenidos en el estudio del RLOD.
- Nivel alto, un tercer nivel que sea superior al LOD teórico.

Cada laboratorio colaborador deberá analizar al menos 8 réplicas de cada nivel de contaminación.

Con los resultados obtenidos se determinarán los siguientes valores:

- Especificidad para el método de referencia

- Especificidad para el método alternativo
- Sensibilidad del método de referencia
- Sensibilidad del método alternativo
- Veracidad relativa
- Proporción de falsos positivos del método alternativo
- Valor para determinar el cumplimiento del AL (Límite de aceptabilidad), en caso de que el valor calculado supere el AL establecido en la norma se considerará que ambos métodos no son equivalentes.

Los datos obtenidos tras la realización del estudio interlaboratorio se compararán con los que se obtuvieron en el estudio comparativo.

5. Métodos cuantitativos

5.1 Estudio comparativo

a) Estudio de veracidad relativa (RT)

Para determinar la veracidad relativa de los métodos cuantitativos se realiza una comparación de resultados obtenidos por el método de referencia y alternativo en muestras idénticas.

Se analizarán al menos 15 muestras de cada categoría seleccionada en el alcance de la validación, tratando de emplear al menos 3 tipos de alimentos para cada una de las categorías. Las muestras deberán estar contaminadas en diferentes niveles de forma que cubran el rango de concentración en el que se encuentra de forma natural el microorganismo diana.

Los resultados se analizan mediante el método de Bland-Altman.

b) Estudio del perfil de exactitud

El objeto del perfil de exactitud es determinar que los resultados obtenidos por el método alternativo no difieren de forma significativa (por encima del criterio de aceptabilidad) con respecto a los obtenidos en el método de referencia en muestras idénticas.

El estudio del perfil de exactitud se lleva a cabo en cada una de las categorías del alcance, empleando al menos 1 tipo de alimento. Se analizarán 6 muestras de cada tipo, contaminadas de forma artificial, a diferentes niveles de contaminación, de forma que se cubra el rango completo de contaminación del tipo seleccionado.

De cada muestra se realizarán 5 réplicas.

Los resultados obtenidos nos van a permitir obtener, entre otros datos, el intervalo de tolerancia esperado o β -ETI, este valor indica el rango donde se van a encontrar los resultados de cada una de las concentraciones analizadas. Este valor se va a comparar con el criterio de aceptación (AL) que va a determinar si ambos métodos son equivalentes.

c) Estudio del límite de cuantificación (LOQ)

El estudio del límite de cuantificación sólo se debe llevar a cabo en aquellos métodos en los que el resultado final no se obtenga mediante el recuento de colonias.

El LOQ se llevará a cabo en cada una de las categorías en las que se ha realizado el perfil de exactitud. Se analizan 10 muestras blancas para cada categoría. A partir de los resultados obtenidos se calcula la desviación estándar, siendo el LOQ 10 veces la desviación estándar.

d) Estudio de inclusividad y exclusividad

La inclusividad y exclusividad sólo se ejecutará en aquellos métodos de recuento dirigidos a microorganismos específicos.

Se seleccionarán 50 cepas para el estudio de inclusividad y 30 para el estudio de exclusividad.

A diferencia de este estudio en la validación de métodos cualitativos, los cultivos puros se ensayarán por los métodos alternativo y de referencia y en el caso de la inclusividad se empleará un agar no selectivo.

5.2 Ejercicio interlaboratorio

De acuerdo con la norma UNE EN ISO 16140-2:2006 el estudio interlaboratorio debe producir un mínimo de 8 laboratorios colaboradores con resultados válidos

Para llevar a cabo el interlaboratorio se seleccionará un solo tipo de alimento seleccionado entre todas las categorías que se han evaluado en el estudio comparativo. Se prepararán las muestras con tres niveles de contaminación, nivel bajo, medio y alto, de forma que los tres niveles cubran el rango completo del método alternativo. Cada laboratorio recibirá una muestra por cada nivel de contaminación que deberá analizar por duplicado mediante el método de referencia y el método alternativo.

Con los resultados obtenidos se determinarán el perfil de exactitud, estableciendo los valores de β -ETI para establecer si ambos métodos son equivalentes.

Los datos obtenidos tras la realización del estudio interlaboratorio se compararán con los que se obtuvieron en el estudio comparativo.

6. Certificación.

Una vez realizada la validación, el método puede ser certificado. Para ello una entidad de certificación deberá evaluar los resultados obtenidos en la validación y realizar una auditoría para verificar el proceso de fabricación del método alternativo, y de forma específica los controles de calidad que se han implementado en dicho proceso.

La entidad de certificación emitirá su dictamen en base a todos los datos evaluados.

La certificación tiene un periodo de validez determinado, durante el cual se realizan auditorías de seguimiento anual, se verifican y evalúan posibles cambios en el método y se estudian las posibles reclamaciones o incidencias con respecto al funcionamiento del método que se hayan presentado.