

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS ALTERNATIVOS

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. En este sentido, el actual Reglamento 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) recoge en su considerando 24 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"* y 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."*

Así pues, existen referencias legislativas que reconocen el empleo de los mismos si bien con limitaciones como la necesidad de evidenciar la validez de estos métodos empleando un procedimiento claramente establecido así como, en el caso de métodos registrados, la necesaria certificación de terceros que avalen esta validez de forma independiente, como puede ser los certificados de validación emitidos por AFNOR (www.afnor.fr) MicroVal (www.microval.org) NordVal (www.nmkl.org) o AOAC (www.aoac.org).

También la Norma ISO 17025:2005 que establece los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, indica en su apartado 5.4.5.2 que *"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"*. Dicha validación puede haber sido realizada previamente por el organismo que ha desarrollado el método, por el laboratorio o bien por organismos de certificación.

Así pues, un requisito imprescindible para poder emplear estos métodos y lograr su reconocimiento (lo que en muchos casos limita su implantación) es la necesaria validación del mismo.

Esta validación debe ser contemplada desde dos perspectivas diferentes:

- **Validación inicial o completa**, realizada con un protocolo extenso en el que se contempla una primera fase de validación por parte de un laboratorio experto y una segunda fase que incluye la realización de un ejercicio colaborativo con la participación de varios laboratorios, y 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)
- **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.

2.- DEFINICIONES

Validación: Confirmación mediante el examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto (ISO 17025 apdo. 5.4.5.1)

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

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

Sensibilidad relativa: 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%)

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

Nivel de detección: Menor número de microorganismos que puede detectarse en una muestra

Inclusividad: Capacidad para detectar el analito entre un amplio grupo de cepas diana.

Exclusividad: Ausencia de interferencia en el método de un grupo de cepas no diana.

Linealidad: Aptitud del método para dar resultados que están en proporción con la cantidad de microorganismos presentes en la muestra

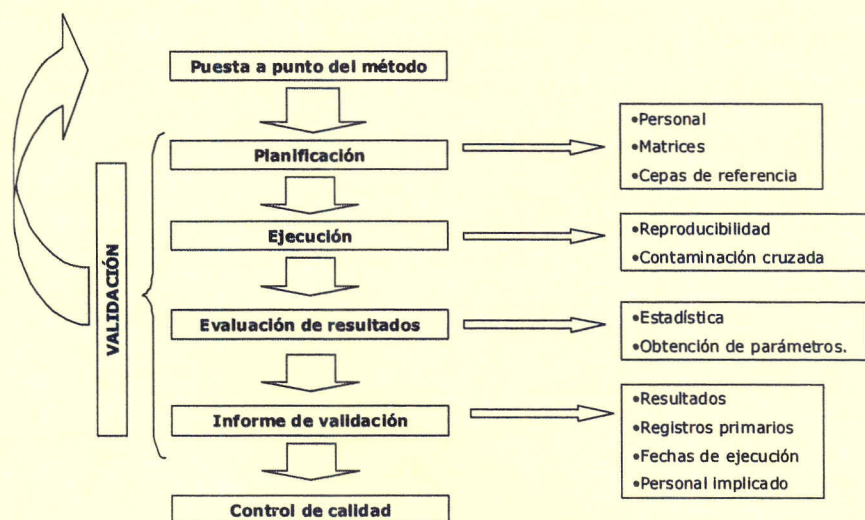
Exactitud relativa: Grado de concordancia entre un resultado de análisis y el valor de referencia aceptado

Límite de cuantificación: La menor cantidad de microorganismos que puede ser medido con una precisión y exactitud definidas

Repetibilidad: Realización de los ensayos en las mismas condiciones (mismo analista, equipos, medios de cultivo...)

Reproducibilidad: Realización de los ensayos en las condiciones más diversas (distinto analista, equipos, días, medios de cultivo...)

3.- VALIDACIÓN DE MÉTODOS ALTERNATIVOS



3.1.- MATRICES

Lo ideal es trabajar con muestras naturalmente contaminadas o al menos que tengan una distribución lo más amplia posible.

Si no es posible trabajar con alimentos contaminados naturalmente se debe recurrir a la contaminación artificial. Los niveles de contaminación deben permitir simular el comportamiento de muestras naturales.

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 (especies, salsas, huevos, pastas, cereales, bebidas)	Alimentación animal

Una validación completa debería incluir al menos 60 resultados por cada categoría de alimentos, siendo deseable que un 50% estén contaminados y otro 50% sean negativos pero con contaminación natural.

3.2.- PREPARACIÓN DE INÓCULOS

Como se ha indicado anteriormente, la utilización de muestras para el estudio de validación debe ser por orden de preferencia:

- Muestras naturalmente contaminadas
- Muestras contaminadas por mezcla (a partir de otras muestras contaminadas)
- Muestras contaminadas artificialmente con microorganismos diana.

En caso de no disponer de muestras naturalmente contaminadas y sea necesario contaminar artificialmente con cepas de referencia (www.cect.org) o cepas salvajes aisladas del mismo tipo de productos que se van a analizar (las cuales deben ser

previamente caracterizadas).

Se debe asegurar que el inóculo es homogéneo y de una concentración conocida. Para ello se puede establecer la concentración del mismo mediante siembra de 5-10 replicados en medios óptimos no selectivos.

La homogeneidad puede considerarse adecuada si la desviación estándar de la reproducibilidad (RSD) es inferior o igual a la de una distribución ideal de Poisson según las siguientes fórmulas:

$$RSD_{real} = \frac{S}{\bar{X}}$$

$$RSD_{teórico} = \frac{1}{\sqrt{\bar{X}}}$$

Siendo:

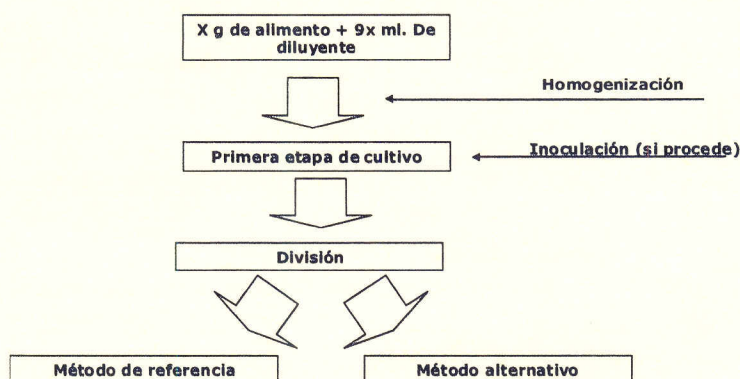
S: Desviación estándar de las colonias contadas en los 5-10 replicados.

X: Media aritmética de las colonias contadas en los 5-10 replicados.

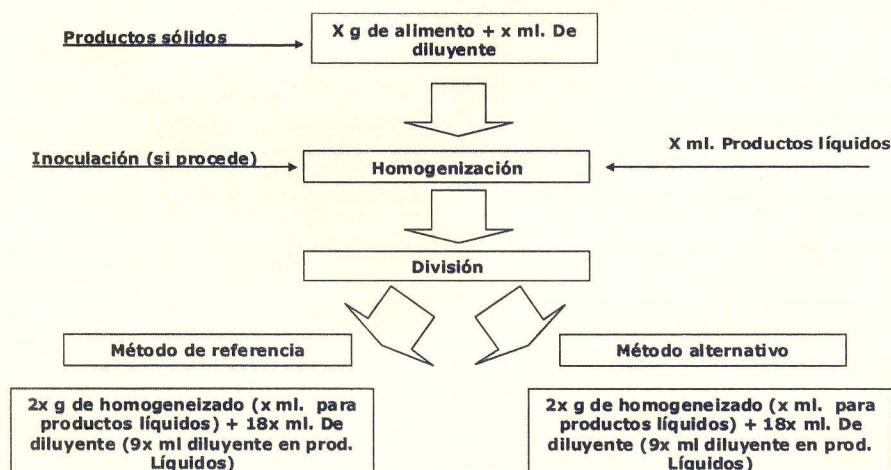
También pueden utilizarse material de referencia certificado con una concentración y pureza conocida comercializado en diversos formatos por diferentes organismos y empresas (Health Protection Agency "<http://www.hpa.org.uk/>", LABAQUA "<http://www.labaqua.com/>" o MicroBiologics "<http://www.microbiologics.com/>)

3.3.- ESQUEMAS DE VALIDACIÓN POR COMPARACIÓN FRENTE AL MÉTODO DE REFERENCIA

DUPLICACIÓN DE MUESTRAS CUANDO AMBOS MÉTODOS TIENEN UNA PRIMERA ETAPA COMÚN



DUPLICACIÓN DE MUESTRAS CUANDO AMBOS MÉTODOS TIENEN DIFERENTES ETAPAS INICIALES



4.- VALIDACIÓN DE MÉTODOS CUALITATIVOS

Parámetros a evaluar en la validación:

Métodos cualitativos (presencia/ausencia)

- Especificidad
- Sensibilidad
- Eficacia
- Desviación positiva y negativa
- Limite de detección
- Inclusividad y exclusividad

4.1.- RENDIMIENTO DEL MÉTODO

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)

Con los datos obtenidos se estiman los parámetros que caracterizan el rendimiento del método.

- EFICACIA RELATIVA (AC):

$$AC = \frac{(PA + NA)}{(NA + PA + PD + ND)} \times 100$$

- ESPECIFICIDAD RELATIVA (SP):

$$SP = \frac{NA}{(NA + PD)} \times 100$$

- SENSIBILIDAD RELATIVA (SE):

$$SE = \frac{PA}{(PA + ND)} \times 100$$

Como criterio arbitrario AC, SP y SE deberían ser $\geq 90\%$ y ND y PD $\leq 10\%$, aunque debería considerarse una validación estadísticamente adecuada como el estudio de datos discrepantes mediante el Test McNemar (Anexo F en ISO 16140:2003)

4.2.- NIVEL DE DETECCIÓN RELATIVA**4.2.1.- Estimación del nivel de inóculo:**

Cepa	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	PROMEDIO	DESVEST	RSD	1,2RSDteor
CECT 4141	75	80	85	70	73	76,6	5,94	0,08	0,14
Salvaje heces	96	125	104	91	110	105,2	13,26	0,13	0,12
Salvaje heces	107	111	122	110	126	115,2	8,29	0,07	0,11
S. hadar	126	122	132	135	140	131	7,14	0,05	0,10
Salvaje heces	112	85	100	98	122	103,4	14,14	0,14	0,12

4.2.2.- Estimación de la concentración de microorganismos en la muestra:

Cepa	Nivel alto		Nivel bajo	
CECT 4141	1,915	ufc/25g	0,383	ufc/25g
Salvaje heces	2,63	ufc/25g	0,526	ufc/25g
Salvaje heces	2,88	ufc/25g	0,576	ufc/25g
S. hadar	3,275	ufc/25g	0,655	ufc/25g
Salvaje heces	2,585	ufc/25g	0,517	ufc/25g
TOTAL	13	ufc/25g	3	ufc/25g

4.2.3.- Resultados obtenidos

Resultados a concentración de 13 ufc/25g

	Negativos	Positivos	Total
Método referencia	0	6	6
Método PCR2	0	6	6

Resultados a concentración de 3 ufc/25g

	Negativos	Positivos	Total
Método referencia	4	2	6
Método PCR2	0	6	6

Resultados muestras negativas

	Negativos	Positivos	Total
Método referencia	6	0	6
Método PCR2	6	0	6

4.2.4.- Conclusión

El límite de detección para la técnica de PCR es inferior a 3 ufc/25g

4.3.- INCLUSIVIDAD Y EXCLUSIVIDAD

Consiste en evaluar la detección de 30 (50) cepas diana y 30 cepas no diana sin estimar el efecto matriz.

El nivel de concentración de cepas diana debe ser de aproximadamente 10 veces el nivel de detección.

Para muestras no diana se inoculará al nivel habitualmente esperable en función del tipo de microorganismo.

4.4.- ESTUDIO INTERLABORATORIO

Su objetivo es determinar la variabilidad de los resultados obtenidos por diversos laboratorios empleando muestras idénticas y comparando los resultados.

Se debe contar con la participación de al menos 10 laboratorios que tengan resultados no discrepantes

En el interlaboratorios se emplean 3 niveles de contaminación (negativo, ligeramente superior al límite de detección y 10 veces superior a este valor), asegurando la homogeneidad y estabilidad de las muestras.

En cada laboratorio se analizan 8 replicados de cada nivel de contaminación con los dos métodos (método de referencia y método alternativo)

El número total de resultados a evaluar es de 480 (240 por cada método)

5.- MÉTODOS CUANTITATIVOS

Parámetros a evaluar en la validación:

Métodos cuantitativos

- Precisión
- Exactitud
- Linealidad
- Desviación positiva y negativa
- Limite de cuantificación

5.1.- PRECISIÓN

A partir de muestras con diferentes 5 niveles diferentes de concentración, realizar 5 replicas de cada muestra (mínimo 2, e idealmente 10) en condiciones de reproducibilidad y estimar RSD, comparándolo con el del método de referencia o bien con el valor RSD teórico.

La precisión del método es aceptable si es inferior o no se desvía en más de un 30% de la del método de referencia o la RSD teórica para cada nivel de inóculo.

El cálculo de la incertidumbre mediante la desviación estándar de la reproducibilidad también puede permitir realizar una estimación de la precisión del método. Para ello es necesaria la realización de análisis por duplicado en condiciones de reproducibilidad de al menos 10 muestras por grupo de alimentos y posteriormente evaluar la diferencia entre ellos con la fórmula (ISO/TS 19036:2006)

$$S_R = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2n}}$$

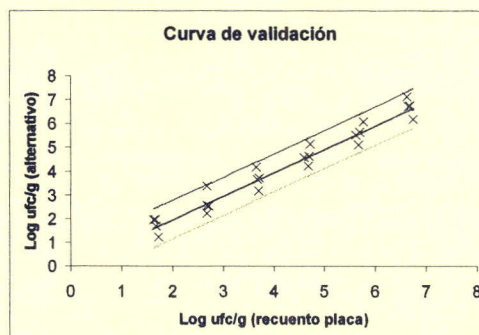
Donde Y_{iA} e Y_{iB} son respectivamente los recuentos de los duplicados de cada muestra el log ufc/g y n el número total de muestras analizadas

5.2.- EXACTITUD Y LINEALIDAD

Se requiere trabajar con 5 niveles diferentes del analito, preferiblemente contaminada naturalmente, para establecer una curva de calibración. Cada muestra se analiza por duplicado como mínimo e idealmente de 5 a 10 replicas, lo que supone que se analizan un mínimo de 10 mediciones e idealmente de 25 a 50 medidas con el método alternativo a evaluar.

Si se dispone de valores de referencia (ver 3.2) es posible determinar la exactitud del método. En caso de que no se disponga de dichos valores, se analizan las mismas submuestras con el método de referencia, en cuyo caso estimaremos la exactitud relativa.

Representar un gráfico donde el eje y se representan los resultados obtenidos con el método alternativo (en valor logarítmico) y en el eje x el valor obtenido con el método de referencia (o con el material de referencia utilizado). En base a este gráfico se obtiene una estimación del método de regresión



A partir de la recta de calibración se estudia el ajuste de la ecuación de la recta: $y = a + bx$, donde no solo debe estudiarse el coeficiente de correlación sino también el ajuste de la ordenada en el origen (a) que debe ser teóricamente nula en el modelo ideal y de la pendiente (b) que debe ser igual a 1.

Las desviaciones de estos valores pueden estimarse mediante modelos de regresión lineal ortogonal o de mínimos cuadrados y la F de Snedecor.

5.3.- LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación puede estimarse mediante el análisis de diluciones (1:2 a $\leq 1:10$) de bajas concentraciones de microorganismos.

Podremos establecer el límite de cuantificación en aquel valor donde la precisión del método se desvía entre un 30% y 50% con respecto a la precisión teórica del método.

También se puede estimar a través del cálculo de la estimación de la dispersión en el Límite de crítico o del ruido de fondo (S_0) o blanco (analizando al menos 6 muestras sin el microorganismo diana) y a través de este se fija el límite de cuantificación $LQ = 10S_0$ que, según AOAC equivale al nivel donde el coeficiente de variación es inferior al 10% ($CV = Sr/X < 10$).

5.4.- ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD

Consiste en evaluar, al igual que se ha realizado en el punto 4.1 y 4.3, mediante el análisis por duplicado de cepas diana positivas y negativas y la comparación entre el valor obtenido con el método de referencia y con el método alternativo.

5.5.- INTERLABORATORIO

Tiene como objetivo determinar comparativamente las características de rendimiento (exactitud y precisión) del método alternativo frente al método de referencia.

Deben participar al menos 8 laboratorios que aporten datos no discrepantes.

Se preparan tres concentraciones de microorganismos así como controles negativos, analizando cada laboratorio 4 submuestras en cada nivel de forma que 2 se miden con el método de referencia y otras 2 con el método alternativo.

En total para cada nivel se requieren 96 resultados.

6.- VALIDACIÓN INTERNA O VERIFICACIÓN

El laboratorio que finalmente va a utilizar el método alternativo debe evaluar la adecuación del método de forma que pueda garantizar que se cumplen con los requisitos del mismo en las condiciones reales de uso, considerando de forma particular la influencia de:

- Matrices habitualmente empleadas por el laboratorio
- Microorganismos diana y flora interfiriente
- Analistas que ejecutan los ensayos
- Equipos y condiciones ambientales
- Medios de cultivo y reactivos

En este sentido, y siempre que se disponga de una validación previa (tal y como se ha descrito anteriormente) no es necesario que el laboratorio realice de nuevo una validación sino que compruebe que en condiciones reales, el rendimiento del método es adecuado.

Para ello podemos partir de los valores que caracterizan al método que deben venir descritos previamente (bien en el certificado de validación del método en su caso o en los datos científicos publicados que garanticen la validez del mismo). Dichos valores deben ser considerados como una referencia puesto que en muchas ocasiones son demasiado amplios como para ser utilizados como un control de calidad interno, por lo que deben revisarse para poder establecer si suponen una referencia adecuada para que el laboratorio verifique su cumplimiento.

La verificación debe ser planificada en función de las características particulares de aplicación del método, siendo de especial interés **el empleo de matrices** que habitualmente vaya a analizar el laboratorio. Estas matrices han podido ser previamente estudiadas durante la validación del método o, como sucede en muchos casos, ser matrices que no han sido evaluadas, por lo que puede que el método alternativo aunque disponga de un estudio de validación previo, no sea adecuado para el uso específico que va a hacer de él el laboratorio de control.

6.1.- MÉTODOS CUALITATIVOS

La verificación puede consistir en comprobar que se puede lograr un adecuado **límite de detección** con las matrices habitualmente empleadas.

Para ello no es necesario realizar diluciones sino únicamente verificar que se puede detectar una concentración de microorganismos igual o inferior a la que se ha obtenido en la validación del método.

La preparación del inóculo se puede realizar como se ha descrito en el punto 3.2. Dicho inóculo se aplica a las matrices a evaluar, empleando 10 replicados. Al menos el 50% de las muestras analizadas deben ser detectadas para poder considerar que el límite de detección relativa es el adecuado.

6.2.- MÉTODOS CUANTITATIVOS

Debe verificarse que el **rendimiento del método** (exactitud y precisión) es el adecuado.

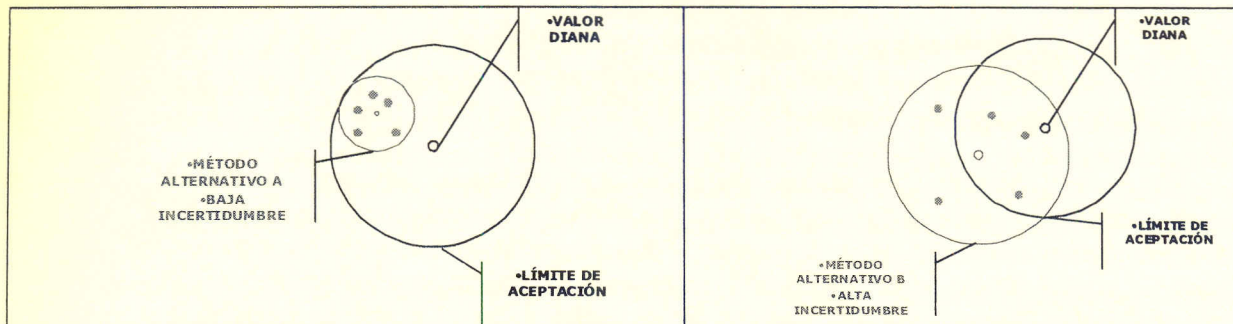
Para ello puede utilizarse los criterios establecidos anteriormente, estimando la **precisión** a partir del análisis por duplicado 10 muestras de cada una de las matrices habitualmente analizadas en el laboratorio y estimando sus valores acorde a la fórmula incluida en 5.1 y comprobando que su valor es igual o inferior al valor de referencia.

Debe considerarse que dicho valor de referencia ha sido obtenido en condiciones de reproducibilidad con datos procedentes de varios laboratorios, mientras que en este caso solo se ha empleado los valores de nuestro laboratorio, por lo que debe ponerse el máximo énfasis de aplicar las condiciones más diversas posibles (diferentes analistas, equipos, lotes de medios de cultivo...)

La **exactitud** puede estimarse mediante la comparación de los valores de t_{student} tabulados para una distribución de Poisson y la t_{student} obtenidos por la media de las diferencias entre el valor de referencia y el obtenido en las diversas réplicas analizadas con el

método alternativo.

No obstante este enfoque está siendo modificado 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 los siguientes esquemas:



Aunque el método A 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.

7.- INFORME DE VALIDACIÓN

Finalmente, en todos los casos es importante elaborar un informe de validación, además de conservar los datos primarios a partir de los cuales se han realizado estas validaciones.

Este informe de validación debe incluir (siempre que proceda) los siguientes datos:

- Nombre del laboratorio.
- Fechas de realización del ensayo.
- Número, tipo y procedencia de las muestras utilizadas.
- Resultados de los ensayos de selectividad
- Número y nombre de cepas diana y no diana utilizadas
- Resultados de los ensayos de amplificación
- Resultados de los ensayos de sensibilidad
- Información sobre la robustez del método
- Información sobre los controles de calidad utilizados
- Información sobre los equipos utilizados
- Cualquier otra observación sobre las desviaciones surgidas durante el estudio de validación