¿Se ha implementado correctamente un método microbiológico en mi laboratorio? Verificación según ISO 16140-3. Ejemplos prácticos

David Tomás Fornés (David.tomas-fornes@merckgroup.com)

INTRODUCCIÓN

La competencia técnica de los laboratorios de ensayo requiere el uso de métodos apropiados para todas las actividades de laboratorio y adecuados para el uso previsto. La norma ISO 17025:2017 indica que el laboratorio debe emplear métodos normalizados o bien métodos no normalizados que hayan sido debidamente validados.

En microbiología de alimentos, y en particular en Europa, el Reglamento de criterios microbiológicos (Reglamento 2073:2015 y sus sucesivas modificaciones) establece que los análisis microbiológicos deben realizarse mediante los métodos normalizados EN-ISO, pudiendo emplearse métodos alternativos siempre que hayan sido validados con respecto al método de referencia conforme al protocolo de la norma EN-ISO 16140-2.

Así pues, tanto los requisitos de la ISO 17025 como del reglamento europeo, requieren que los laboratorios de análisis microbiológicos empleen métodos normalizados o métodos alternativos validados para el control de seguridad alimentaria o de higiene de los procesos.

Estos métodos no solo deben estar validados acorde los requisitos reglamentarios, su correcta implementación en las condiciones particulares de cada laboratorio (tipos de alimentos, personal, equipos, medios de cultivos etc...)

La nueva norma ISO 16140-3 tiene como objetivo la **verificación de métodos microbiológicos** de análisis de alimentos, de modo que se pueda demostrar que el método normalizado y/o validado **funciona adecuadamente en manos del laboratorio usuario** del mismo acorde a las especificaciones establecidas en los estudios de validación **y es adecuado para el uso previsto**.

VALIDACIÓN FRENTE A VERIFICACIÓN

Es muy frecuente, en el ámbito de la implantación y acreditación de métodos microbiológicos, el indicar que el laboratorio ha "validado" el método, cuando realmente sólo ha demostrado una correcta ejecución del mismo mediante el empleo de un número limitado de matrices. Es importante por ello, establecer una clara diferencia entre ambos conceptos.

La **validación** del método consiste en establecer las características de rendimiento del método analítico y demostrar que dichas características cumplen con las especificaciones requeridas para su uso previsto.

Por el contrario, la **verificación** del método consiste en demostrar que un método validado se ha implementado correctamente en mi laboratorio y es adecuado para el uso previsto que voy a hacer de dicho método (ejm. tipo de matrices analizadas)

En general, para los métodos microbiológicos normalizados, las características de rendimiento pueden resumirse en las siguientes:

Tabla 1: Características de rendimiento de métodos normalizados

Métodos cuantitativos (recuento)	Métodos cualitativos (detección)
Repetibilidad (r)	Especificidad (Sp)
Reproducibilidad (R.)	Sensibilidad (Se)
	Nivel de detección (LOD_{50})

Dichas características son estimadas mediante la realización de ejercicios interlaboratorio realizados sobre diversas matrices representativas del alcance de un método.

Para los métodos alternativos validados frente al método de referencia normalizado, se realizan una serie de estudios encaminados a demostrar equivalencia entre ambos métodos para un rango de matrices siguiendo la norma ISO 16140-2:2016. Generalmente un laboratorio experto es quien compara en una primera etapa ambos métodos para estimar los siguientes parámetros:

Tabla 2: Características de rendimiento de métodos alternativos validados

Métodos cuantitativos (recuento)	Métodos cualitativos (detección)
Exactitud o sesgo (D)	Sensibilidad método alternativo (SE_{alt})
Desviación estándar (S_D)	Sensibilidad método referencia (SE_{ref})
Inclusividad	Veracidad relativa (RT)
Exclusividad	Porcentaje de falso positivos (FPR)
Límite de cuantificación [1]	Nivel de detección relativo ($RLOD_{50}$)
	Inclusividad
	Exclusividad

[1] Solo cuando el método está basado en medidas instrumentales como impedancia o fluorescencia.

En ambos casos, en una segunda etapa se realiza un estudio interlaboratorio para comparar el rendimiento de los métodos en condiciones de reproducibilidad.

Sin embargo, la verificación del método, como se ha indicado anteriormente, no consiste en definir estas características de rendimiento, sino en demostrar que el laboratorio usuario puede ejecutar correctamente el método, realizando un número limitado de experimentos cuyos resultados son evaluados tomando como referencia los valores del método ya validado.

Veamos a continuación, en qué consiste el proceso de verificación de métodos microbiológicos de alimentos

VERIFICACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

El protocolo técnico de verificación consiste en dos etapas diferentes:

1. **Verificación de la implementación**, para demostrar que el laboratorio tiene competencia para ejecutar el método validado.
2. **Verificación de alimentos**, para demostrar que el laboratorio es capaz de obtener resultados válidos con las categorías de alimentos que se analizan rutinariamente.

Para la realización de la verificación es necesario que el laboratorio defina y trabaje considerando el alcance de validación del método así como el alcance de aplicación del método en el laboratorio.

Es por ello necesario que el método a verificar disponga previamente de datos de validación, si bien, para los métodos normalizados no validados, la norma prevé una etapa transitoria.

La verificación de la implementación (etapa 1) implica el análisis de un alimento que ha sido empleado durante la validación (para métodos cualitativos) o al menos que se encuentre dentro del alcance del método y que sean empleado habitualmente por el laboratorio (cuantitativos).

Para la verificación de alimentos (etapa 2) se requiere de un mínimo de cinco alimentos que presenten un potencial reto para el método objeto de verificación y que se deben seleccionar a partir de las diferentes categorías de alimentos analizadas por el laboratorio. El número de categorías puede reducirse si el laboratorio analiza únicamente algunas de ellas, mientras que debe ampliarse en el caso de que, además de alimentos, el laboratorio desee verificar el método para piensos, muestras ambientales y procedentes de producción primaria.

Para seleccionar los alimentos que pueden suponer un reto, deben considerarse las características que supongan en peor escenario debido a un potencial impacto en el rendimiento del método, como por ejemplo:

- Físicas (bajo pH o actividad de agua, alta viscosidad o color),
- Químicas (presencia de inhibidores como enzimas, polifenoles, sal, etc...) o
- Flora competitiva (fermentos, probióticos, alterantes)

VERIFICACIÓN DE MÉTODOS CUALITATIVOS (DETECCIÓN)

La verificación de los métodos cualitativos consiste en el análisis de las matrices inoculadas con bajos niveles de microorganismos, al objeto de determinar el Nivel de Detección estimado ($eLOD_{50}$) y compararlo con el Nivel de Detección (LOD_{50}) de la validación del método.

El número de replicados necesarios para cada alimento a verificar, depende del protocolo que seleccione el laboratorio:

Tabla 3: Número de replicas en función del protocolo de verificación.

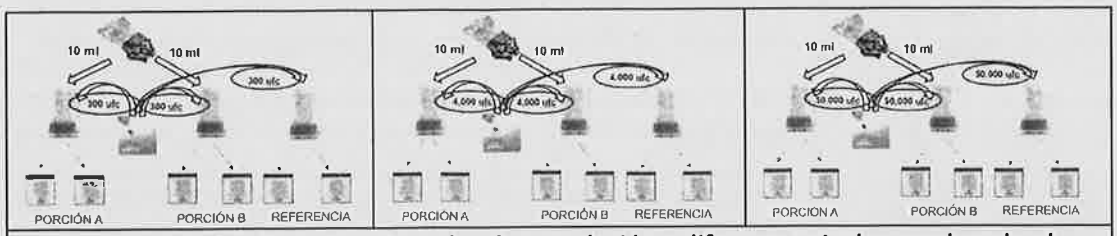
Protocolo	Nivel de inoculación por porción de muestra (ejm. 25g)					Número replicas total
	9 x LOD_{50}	3 x LOD_{50}	1 x LOD_{50}	3 a 5 ufc	Blanco	
1	1	4	4	-	1	10
2	-	3	5	-	1	9
3	-	-	-	7	1	8

La elección del protocolo depende de la habilidad del laboratorio para alcanzar el nivel de inoculación deseado. Generalmente se recomienda emplear el protocolo 3 cuando se trabaja con material de referencia certificado de concentración conocida y el protocolo 1 cuando se desconoce exactamente la concentración inoculada. El protocolo 2 se suele emplear cuando el primer protocolo seleccionado no alcanzó los niveles de inóculo deseados y debe ser repetido.

Verificación de alimentos

La verificación de alimentos se realiza mediante la exactitud o mejor dicho el sesgo estimado (eSesgo), es decir, la diferencia entre el valor de referencia obtenido sin matriz, y el resultado de los alimentos inoculados con dicho valor de referencia.

Para ello se debe contar con 5 alimentos de diferentes categorías. Cada alimento se inocula a tres niveles (acorde a los niveles habitualmente analizados por el laboratorio). Para cada nivel de contaminación, se analiza cada alimento empleando un lote diferente en dos porciones (A y B), así como se realiza una porción de análisis sin alimento (referencia).



Verificación de alimentos. Ejemplos de inoculación a diferentes niveles empleando el método alternativo Media-Pad (MERCK).

Para cada nivel de inoculación y alimento, se estima el sesgo como la diferencia entre el valor medio de las porciones A y B (con alimento) y el valor de referencia (sin alimento).

El método se considera verificado si, para cada caso:

eSesgo = valor medio – valor referencia < |0.5 (Log_{10} cfu/g-mL)|.

¿CUÁNDO DEBO VERIFICAR EL MÉTODO?

La verificación de métodos empleando el protocolo reflejado en la ISO 16140-3 no es necesaria si el método ya se ha verificado previamente (ejm. métodos ya acreditados o implementados en el laboratorio).

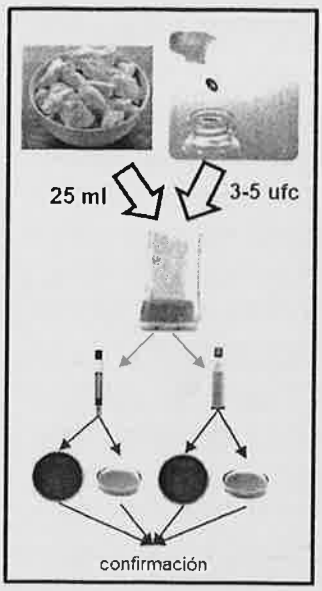
La verificación deberá realizarse cuando:

- Se implementa un nuevo método en el laboratorio.
- Cuando un método ya implementado sufre modificaciones relevantes que se consideran mayores afectando al rendimiento del método y que generalmente requieren también de una re-validación (generalmente asociados a cambios en los medios de cultivo, condiciones de incubación, etc...).
- Cuando el laboratorio amplíe su alcance originalmente contemplado en el método. Dicho alcance debe en cualquier caso encontrarse contemplado originalmente en el método.

Con la futura publicación de la norma prevista para finales de 2020 o principios de 2021, se publicará un documento de transición al objeto de facilitar la verificación de los métodos de referencia que todavía no disponen de datos de validación publicados.

Dicho período de transición es válido hasta finales de 2027 y los protocolos a seguir en los casos que aplique vienen reflejados en el Anexo F de la nueva norma. Básicamente se indica en dicho anexo que, en el caso en que el método de referencia no esté validado, no se debe realizar la

A modo de ejemplo, si se selecciona el protocolo 3, el protocolo a realizar para la verificación del método de *Salmonella* spp (ISO 6579-1:2017) sería:



Para la verificación de la implementacion, se ha seleccionado cuajada fresca de leche dado que este producto está incluido en la validación de la norma. El protocolo indicado en la imagen debe repetirse un total de 7 veces para la matriz.

Para la verificación de alimentos, se realizar el mismo protocolo indicado sobre al menos 5 alimentos de diferentes categorias que analice el laboratorio de forma rutinaria y que supongan el "peor escenario", repitiendo el protocolo de nuevo 7 replicas por matriz.

Para cada matriz, es necesario realizar la confirmación de al menos una réplica.

El método se considera validado si para cada matriz, se obtienen al menos 6 resultados positivos de las 7 réplicas inoculadas con 3-5 ufc.

El empleo de los protocolos 1 o 2 indicados en la tabla 3, requiere del uso de tablas estadísticas disponibles en la norma ISO 16140-3 para la estimación del $eLOD_{50}$, de manera que el método se considera verificado si el $eLOD_{50} \leq 4 \times LOD_{50}$ obtenido durante el estudio de validación. En caso de no disponer del LOD_{50} del método empleado, dado que el alimento seleccionado por el laboratorio no han sido contemplado en el estudio de validación o bien porque el método de referencia no ha sido validado, el LOD_{50} se reemplaza por el valor teórico de 1 ufc/muestra.

VERIFICACIÓN DE MÉTODOS CUANTITATIVOS

El protocolo de verificación de métodos cuantitativos, al contrario que en el caso anterior, requiere de dos protocolos diferenciados para las dos etapas a considerar

Verificación de la implementación del método:

Consiste en determinar la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR}) mediante el análisis duplicado de un alimento en condiciones de reproducibilidad. Dichos duplicados deben repetirse al menos en 10 ocasiones.

A partir de los diez resultados duplicados (en valor logarítmico) se estima el valor de S_{IR} :

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

Los resultados obtenidos para ese alimento, se comparan con el valor mínimo de la desviación estándar de reproducibilidad (S_R) obtenido a partir de la validación del método a evaluar.

La verificación de la implementación del método se considera satisfactoria si:

S_{IR} verificación $\leq 2 \times S_R$ mínima de validación

primera etapa de verificación de la implementación, realizando únicamente los ensayos requeridos para la verificación de matrices.

CONCLUSIÓN

La verificación de métodos permite al laboratorio disponer de datos objetivos para demostrar la correcta implantación del mismo en sus condiciones particulares y asegurar la adecuación al uso previsto.

Los parámetros a considerar, número de replicas y evaluación de resultados se puede encontrar resumidos en la siguiente tabla:

Tabla 4: Resumen protocolos de verificación

Método	Carac.	Implementación	Verificación matrices	Criterio
Cualitativo	$eLOD_{50}$	1 alimento x 7 réplicas con 3-5 ufc/muestra [1] [3]	5 alimentos x 7 replicas con 3-5 ufc/muestra [1]	Protocolo 1 y 2 : $eLOD_{50} \leq 4 \times LOD_{50}$ [2] Protocolo 3 : ≥ 6 positivos de 7 muestras
Cuantitativo	S_{IR}[3]	1 alimento x 10 réplicas x duplicado [3]	No aplicable	$S_{IR} \leq 2 \times S_R$ mínima de validación[3]
	eSesgo	No aplicable	5 alimentos x 3 réplicas x (duplicado & referencia)	eSesgo ≤ 0.5 Log_{10} ufc

[1] Inóculo indicado para el protocolo 3. Para los protocolos 1 y 2 se emplean al menos 3 diluciones con 1 a 4 réplicas por dilución, inoculadas con valores estimados en función de la validación del método.

[2] LOD_{50} = 1 ufc/muestra en ausencia de datos de validación.

[3] No aplicable en ausencia de datos de validación.

Debe considerarse que el proceso de validación es complejo y requiere de un proceso largo y costoso, por lo que únicamente métodos de referencia o métodos alternativos validados pueden ser verificados por el laboratorio usuario.