

GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE MÉTODOS DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS

4	INTRODUCCIÓN	3
5	OBJETIVO	4
6	ALCANCE	4
7	ABREVIATURAS	4
8	DEFINICIONES	5
9	CAPÍTULO 1- LA MEDIDA EN MICROBIOLOGÍA	6
10	1.1 LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS EN MICROBIOLOGÍA	6
11	1.2 TIPOS DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS:	8
12	1.2.1 LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS BASADOS EN CULTIVO	9
13	1.2.1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	10
14	1.2.1.2 MÉTODOS DE CULTIVO PARA RECUENTO O ENUMERACIÓN	11
15	1.2.1.3 MÉTODOS DE CULTIVO PARA DETECCIÓN	12
16	1.2.2 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN O DE CONFIRMACIÓN	13
17	1.3 EL MATERIAL DE REFERENCIA EN MICROBIOLOGÍA	14
18	1.4 CONSIDERACIONES PARTICULARES DE LA MEDIDA EN MICROBIOLOGÍA	19
19	CAPÍTULO 2 - ADECUACIÓN DE USO DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.	21
20	2.1 ¿VALIDAR O VERIFICAR?	23
21	2.2 REQUISITOS PREVIOS PARA LA EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO	
22	MICROBIOLÓGICOS	25
23	2.2.1 SELECCIÓN DEL MÉTODO	26
24	2.3 PREPARACIÓN DEL INÓCULO	27
25	2.4 SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS	30
26	2.5 SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	31
27	CAPÍTULO 3- VALIDACIÓN	32
28	3.1 PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO PARA VALIDACIÓN	36
29	3.1.1 PROTOCOLO PARA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO EN UN SOLO LABORATORIO	38
30	3.1.1.1 ESTUDIO DE VALIDACIÓN EN UN SOLO LABORATORIO	38
31	3.1.1.2 CON APROXIMACIÓN FACTORIAL	38
32	3.1.1.3 ESTUDIO DE VALIDACIÓN EN UN SOLO LABORATORIO CON APROXIMACIÓN CONVENCIONAL	42
33	CAPÍTULO 4 - VERIFICACIÓN	43

34	4.1	PARÁMETROS DE DESEMPEÑO	46
35	4.1.1	CUALITATIVOS	46
36	4.1.1.1	NIVEL DE DETECCIÓN CINCUENTA ESTIMADO (E _{LOD 50}).	46
37	4.1.2	CUANTITATIVOS	49
38	4.1.2.1	DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE REPRODUCIBILIDAD INTRA-LABORATORIO	49
39	4.1.1.2	SESGO ESTIMADO	50
40		BIBLIOGRAFIA	54
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			
61			
62			
63			
64			
65			

66

67 INTRODUCCIÓN

68

69 El diagnóstico microbiológico tiene una repercusión decisiva en el ámbito de aplicación de la industria,
70 la salud pública o del medio ambiente. La ejecución de los ensayos debe asegurar la confiabilidad de
71 sus resultados, a través del cumplimiento de una serie de requisitos técnicos y garantías, que permitan
72 entregar resultados trazables y comparables; avalados por un sistema de gestión de calidad.

73 A partir de la publicación del estándar ISO/IEC 17025, la validación y la verificación de los métodos
74 microbiológicos cobra un papel fundamental y el trabajo de los laboratorios se centra en demostrar,
75 de manera objetiva, frente a los organismos que otorgan reconocimiento y acreditación, que el
76 método o el sistema de medición seleccionado cumple los parámetros de desempeño establecidos y
77 que el laboratorio es competente para ejecutarlo.

78 La importancia de la validación de métodos de ensayo microbiológicos se ve reflejada en la
79 normalización de esta actividad. Internamente, la Organización Internacional de Estandarización (ISO)
80 en los Comités Técnicos (CT) elabora documentos para orientar la validación/verificación; por ejemplo,
81 el Comité Técnico ISO/CT 34 de Productos Alimenticios, publica los estándares de la familia de las ISO
82 16140, el Comité ISO/CT 147 de Calidad del Agua publica el estándar ISO 13843 y el Comité ISO/CT
83 212 de Ensayos en Laboratorio clínico y tests con sistemas de Diagnóstico *in-vitro* es responsable del
84 estándar ISO 15195. Asimismo, hay publicaciones científicas de otras organizaciones que pueden ser
85 consultadas como las de AOAC, FDA, EPA, Standard Methods for the Examination of Water and
86 Wastewater, las farmacopeas y documentos de Eurachem; así como también documentación de
87 organismos de certificación tales como AFNOR, NMKL y Microval.

88 Esta guía intenta recoger la información de normas y protocolos internacionales haciendo más fácil el
89 acceso y entendimiento en lo que se debe hacer, para evaluar el desempeño de los métodos
90 microbiológicos en alimentos. La guía está dirigida a los laboratorios de ensayos microbiológicos que
91 estén interesados en evaluar los parámetros de desempeño que pueden ser medidos o comprobados
92 y otorgan datos sobre el desempeño del método en unas determinadas condiciones de ejecución y
93 para un uso previsto.

94 El documento está organizado en capítulos, los cuales incluyen las consideraciones generales de la
95 medida en microbiología y los lineamientos para la validación y la verificación de métodos
96 microbiológicos.

97 Los lectores deben saber, que no hay un acuerdo universal sobre las definiciones de los términos
98 usados en la validación de métodos, por esta razón la guía no hace énfasis en las definiciones, sin
99 embargo, como referencia se usan las del VIM, las de las guías AOAC y las de la ISO.

100

101

102

103

104

105

106 **OBJETIVO**

107 Disponer de un documento que identifique las actividades y consideraciones necesarias para llevar a
108 cabo la evaluación de desempeño de los métodos microbiológicos de cultivo cuantitativos y
109 cualitativos, en matrices de alimentos de consumo humano y animal, siguiendo los lineamientos
110 internacionales, además de facilitar la comprensión y el cumplimiento de requisitos para la
111 competencia de los laboratorios de microbiología.

112

113 **ALCANCE**

114 La guía está dirigida a los laboratorios de ensayo microbiológicos en alimentos de consumo humano y
115 animal, que detecten y/o cuantifiquen microorganismos de interés y que estén interesados en evaluar
116 los parámetros de desempeño del método para un uso previsto, bajo condiciones establecidas para
117 que entreguen datos confiables y comparables.

118

119 **ABREVIATURAS**

120

ISO	Organización Internacional de Normalización
AOAC	Asociación de Colaboración Analítica oficial (AOAC) Internacional
ICMSF	Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos
VIM	Vocabulario Internacional de Metrología
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UFP	Unidades Formadoras de Placas
NMP	Número más probable
CEN	Comité Europeo de Estandarización
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
MR	Material de Referencia
MRC	Material de Referencia Certificado
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
WFCC	Federación Mundial de Colecciones de Cultivos
ECCO	Organización Europea de Colecciones de Cultivos
GTC	Guía Técnica Colombiana
NMKL	Comité Nordico de Análisis de Alimentos
AFNOR	Asociación Francesa de Normalización
NEN	Instituto de Normalización de los Países Bajos
DIN	Instituto Alemán para la Normalización
IDF	Federación Internacional de Lechería
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
BAM	Manual Analítico Bacteriológico
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
OIE	Organización Internacional de Sanidad Animal
MicroVal	Organismo internacional de certificación para la validación y aprobación de métodos
FSIS	Servicio de inspección y seguridad alimentaria

121

122

123

124

125 DEFINICIONES

126

127 **Analito:** microorganismos o productos (e.j DNA, proteínas, toxinas) medidos o detectados por un
128 método de análisis ¹.

129 **Alcance de la validación:** analitos, concentraciones y matrices para los cuales un método de análisis
130 validado puede ser usado satisfactoriamente ².

131 **Cepa objetivo (target):** Cepa, definida de acuerdo con el alcance del método de referencia, que se
132 espera que pueda ser detectada por el método alternativo².

133 **Ensayo de aptitud:** : Es una evaluación del desempeño de los participantes con respecto a criterios
134 previamente establecidos mediante comparaciones interlaboratorios ³.

135 **Estudio interlaboratorio:** Estudio adelantado por varios laboratorios de ensayo con muestras
136 idénticas en el mismo momento, los resultados pueden ser usados para estimar parámetros de
137 desempeño de un método alternativo ².

138 El objetivo del estudio interlaboratorio es determinar la variabilidad de los resultados obtenidos por
139 diferentes laboratorios en la misma muestra ².

140 **Estudio colaborativo:** Un estudio de validación realizado por múltiples laboratorios para estimar los
141 parámetros críticos de rendimiento del método candidato⁴.

142 **Falsos positivos (Desviación positiva):** Cuando el resultado confirmado del método alternativo es
143 positivo y el resultado del método de referencia es negativo².

144 **Falsos negativos (Desviación negativa):** resultado negativo del método alternativo cuando el
145 resultado del método de referencia correspondiente es positivo ².

146 **Límite de detección (LOD):** Concentración de analito obtenida mediante un procedimiento de
147 medición definido, con una probabilidad de detección determinada, ejemplo: LOD 50 o LOD 95.

148 En microbiología la determinación se basa en replicados de análisis con tres niveles de inoculación del
149 analito objetivo. Aplica para métodos cualitativos en microbiología. Para ampliar la información,
150 consultar ISO 16140-1. Vocabulario².

151 **Límite de detección 50 (LOD₅₀):** concentración de analito en la cual, la probabilidad de detección es
152 del 50% ¹.

153 **Método de referencia:** método internacionalmente aceptado y ampliamente reconocido ².

154 **Método normalizado:** aquellos publicados como normas oficiales o publicados por organismos de
155 normalización nacionales o internacionales. Ejemplo FDA, USDA, ISO, AOAC ⁵.

156 **Método no normalizado:** Métodos propios o desarrollados por el laboratorio, obtenidos de
157 publicaciones científicas, así como métodos normalizados que han sido ampliados, modificados o
158 usados fuera del alcance propuesto ⁵.

159 **Método alternativo:** Método de análisis que detecta o cuantifica, en una determinada categoría de
160 productos, el mismo analito que puede ser detectado o cuantificado por el método de referencia.
161 Métodos sometidos a validación ².

162 **Método de identificación:** Método utilizado para confirmar la identidad de un analito, por ejemplo,
163 serotipificación ⁶.

164 **Precisión:** grado de acuerdo entre resultados independientes bajo determinadas condiciones ¹.

165 **Repetibilidad:** Precisión en condiciones de repetibilidad ⁷.

166 **Condiciones de repetibilidad:** Condiciones en las que se obtienen resultados de ensayos
167 independientes, con el mismo método en elementos de ensayo idénticos, en el mismo laboratorio por
168 el mismo operario y con el mismo equipo en intervalos cortos de tiempo ⁷.

169 **Reproducibilidad:** Precisión en condiciones de reproducibilidad ⁷.

170 **Condiciones de reproducibilidad:** Condiciones en las que se obtienen resultados de ensayos
171 independientes, con el mismo método en elementos de ensayo idénticos en diferentes laboratorios,
172 con diferentes operarios y utilizando diferentes equipos⁷.

173 **Veracidad relativa:** Grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método alternativo
174 frente al método de referencia , usando muestras idénticas ².

175 **Sensibilidad:** capacidad del método de referencia o del alternativo para detectar el analito
176 correctamente en la presunta inspección ².

177 **Selectividad:** El grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares
178 en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar ⁸. Se puede
179 expresar como la relación entre el número de colonias objetivo y el número total de colonias en una
180 muestra ⁹. También se conoce como especificidad analítica.

181 **Trazabilidad:** La trazabilidad se refiere a la integridad de la información sobre cada paso en una cadena
182 de proceso. Es la capacidad de verificar el historial, la ubicación o la aplicación de un artículo mediante
183 una identificación documentada y registrada ¹⁰. La trazabilidad en microbiología es la trazabilidad
184 documental o rastreabilidad del origen del microorganismo a una fuente o un origen relevante, que
185 debe garantizar la colección biológica en la cual está depositado el espécimen.

186 **Trazabilidad metrológica:** propiedad de un resultado de medida, por el cual el resultado puede
187 relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de
188 calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida¹¹. ILAC considera que
189 los elementos necesarios para confirmar la trazabilidad metrológica son: una cadena de trazabilidad
190 metrológica ininterrumpida a un patrón internacional, un patrón nacional, una incertidumbre de
191 medida documentada, un procedimiento de medida documentado, una competencia técnica
192 reconocida, al SI (sistema internacional de unidades) y a los intervalos entre calibraciones ¹¹.

193 **Unidades formadoras de colonia (UFC):** Las UFC son el número mínimo de células separables sobre la
194 superficie o dentro de un medio de agar semisólido, que da lugar al desarrollo de una colonia visible
195 del orden de decenas de millones de células descendientes. La UFC es una unidad de medida que no
196 forma parte del sistema internacional de medida SI.

197 **CAPÍTULO 1- LA MEDIDA EN MICROBIOLOGÍA**

198

199 **1.1 LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS EN MICROBIOLOGÍA**

200

201 Los métodos de ensayo microbiológicos son importantes en diferentes ámbitos gubernamentales. A
202 nivel nacional para hacer inspección, vigilancia y control, en el comercio internacional para determinar
203 la conformidad con los requisitos microbiológicos, en el comercio nacional para asegurar el
204 cumplimiento de los requisitos acordados, en la industria para garantizar la calidad y el control de los
205 procesos, en la academia para adelantar procesos de investigación y en los laboratorios de referencia
206 para generar datos de vigilancia epidemiológica ¹².

207 Los laboratorios que ejecutan métodos microbiológicos, se espera que estén adecuadamente
208 equipados para que cumplan los requisitos de bioseguridad y que cuenten con personal competente,
209 así mismo, es muy deseable que tengan sus métodos acreditados bajo el estándar ISO/IEC 17025 que
210 les permite demostrar la competencia técnica para ejecutar los ensayos y contar con el
211 reconocimiento de resultados válidos en el mundo globalizado ¹³. En Colombia, el Organismo
212 Nacional de Acreditación ONAC, cuenta con acuerdos de reconocimiento internacionales con el
213 propósito de facilitar las transacciones comerciales entre los países firmantes; tanto para las
214 acreditaciones como para las evaluaciones de conformidad. El reconocimiento internacional le
215 permite al Subsistema Nacional de la Calidad de Colombia - SICAL, ser comparable con cualquier otra
216 infraestructura de la calidad en el mundo para la aceptación de los resultados de evaluación de
217 conformidad acreditados. El ONAC cuenta con reconocimientos otorgados por la Cooperación
218 InterAmericana de Acreditación (IAAC por sus siglas en inglés) (cooperación regional), Cooperación
219 Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC por sus siglas en inglés) y Foro Internacional de
220 Acreditación (IAF por sus siglas en inglés)¹⁴.

221 Es muy importante que los métodos empleados sean confiables y, por lo tanto, es necesario antes de
222 realizar el análisis, determinar o evaluar las características de desempeño de los métodos usados, para
223 asegurar que se están utilizando métodos debidamente validados y verificados. También, es
224 importante que las partes interesadas estén de acuerdo con el método empleado para facilitar la
225 cooperación entre laboratorios con el reconocimiento mutuo de los métodos utilizados y,
226 consecuentemente, facilitar el comercio internacional de bienes ¹². El continuo desarrollo y
227 actualización de las técnicas y equipos cada vez más complejos han despertado el interés de los
228 profesionales en microbiología en la validación o verificación de los métodos microbiológicos, con el
229 fin de garantizar la validez y la calidad de los resultados de medición¹⁵.

230 Los métodos normalizados en microbiología han sido desarrollados por organizaciones
231 internacionales como ISO (International Organization for Standardization), AOAC (Association of
232 Official Analytical Collaboration International), CEN (Comité Européen de Normalisation), NMKL
233 (Nordisk Metodikkommitté för Livsmeddel), AFNOR (Association Française de Normalisation), NNI
234 (Nederlands Normalisatie Instituut), DIN (Deutsches Institut für Normung), IDF (International Dairy
235 Federation), ICMSF (The International Commission on Microbiological Specifications for Foods)¹²,
236 también algunas entidades regulatorias han publicado sus propios métodos oficiales como FDA BAM
237 (US Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual), USDA (US Department of
238 Agriculture Food Safety Inspection Service, Microbiology Laboratory Guidebook)¹⁶. La intención
239 principal de estos métodos, es proveer a los usuarios con metodologías analíticas internacionalmente
240 aceptadas que permitan obtener resultados equivalentes y comparables en diferentes instalaciones
241 (laboratorios). En esencia, estos métodos sirven solo como directrices analíticas, sin embargo, han
242 sido históricamente recomendados por los gobiernos y agencias de comercio y están reconocidos
243 como métodos oficiales para detección/enumeración de organismos en alimentos, por lo tanto son
244 considerados como los métodos de referencia ¹².

245 Los métodos normalizados pueden ser definidos como aquellos con una metodología reconocida que
246 ha sido estudiada de una manera colaborativa y que han sido validados antes de ser aceptados ¹⁶. No

247 todos los métodos normalizados de ISO en alimentos han sido validados, pero a pesar de la falta de
248 estudios de validación extensivos, los métodos de ISO han sido internacionalmente aceptados como
249 métodos de referencia. Hace algunos años la organización ha sometido a validación algunos de sus
250 métodos y los detalles han sido publicados en anexos¹². Reconociendo esta dificultad, el estándar de
251 ISO 16140-3 de 2021 presenta un anexo para abordar estos casos y que puede ser útil igualmente para
252 la verificación de aquellos métodos AOAC, FDA, USDA, IDF, entre otros, de los cuales no se encuentran
253 publicados los datos de la validación.

254 También están los métodos no normalizados, los métodos desarrollados por el laboratorio y los
255 métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificados, y en estos casos la
256 ISO/IEC 17025 requiere que se validen estos métodos para demostrar que se puede satisfacer las
257 necesidades de la aplicación o del campo de aplicación dados y que sean pertinentes para las
258 necesidades del cliente y coherentes con los requisitos especificados¹⁷.

259 Nota 1: Métodos normalizados, son aquellos publicados en normas internacionales, nacionales, regionales o por
260 organizaciones técnicas reconocidas o en revistas científicas pertinentes y aceptadas por el sector técnico en cuestión¹⁸.

261

262 1.2 TIPOS DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS:

263

264 Los métodos de ensayo microbiológicos pueden incluir metodologías convencionales, rápidas o
265 alternativas y estar basados en técnicas de cultivo (colonias, turbidez, cambio de color o
266 fluorescencia), técnicas de microscopía, técnicas moleculares¹³, técnicas inmunoenzimáticas, por
267 citometría o técnicas de identificación que de manera general pueden dividirse en:

268 1- Métodos cualitativos: Métodos de análisis cuya respuesta va a depender de la concentración
269 del analito y cuyo resultado final es la presencia o ausencia del analito, el cual es detectado
270 directa o indirectamente en una determinada cantidad de muestra (por encima de un valor
271 umbral definido por el propio método) generalmente 25g o mL¹⁹. Para facilitar la recuperación
272 de los microorganismos estresados la porción de muestra se pre-enriquece en un caldo de
273 enriquecimiento no selectivo, luego pasa a una etapa de enriquecimiento selectivo para
274 seleccionar el microorganismos objetivo, posteriormente pasa a una etapa de subcultivo para
275 aislamiento en medio selectivo-diferencial y por último confirmación de colonias
276 presuntivas²⁰. Esta detección puede darse por turbidez, cambios de color, fluorescencia o
277 presencia de gas.

278 2- Métodos cuantitativos: método de análisis cuya respuesta es conocer la cantidad de analito
279 medida directa o indirectamente en una determinada cantidad de muestra¹⁹. En esta
280 categoría se encuentran:

281 a. Método de Número más Probable (NMP): Es un método semicuantitativo, donde hay
282 una estimación estadística basada en la teoría de probabilidades, para definir el
283 número más probable de microorganismos en una muestra por unidad de masa o
284 volumen²¹. Esta enumeración se realiza usando un medio líquido y se utiliza cuando
285 se estima una baja enumeración del microorganismo objetivo (<100 UFC/go mL) y una
286 abundante flora microbiana acompañante²².

287 b. Métodos de enumeración o de recuento: Se hace un conteo real del número de
288 unidades formadoras de colonia (UFC) existentes en la porción de muestra analizada.
289 En esta categoría se pueden encontrar: el recuento en placa con agar (superficie y

290 profundidad), filtración por membrana, recuento en placa en espiral, recuento sobre
291 láminas hidratables y recuento sobre pads absorbentes. En general, la enumeración
292 en medios sólidos se basa en la capacidad de muchos microorganismos para producir
293 colonias en o sobre medios de agar que pueden reconocerse como tales a simple vista
294 o con la ayuda de una lupa ²⁰.

295 c. Observación microscópica: determinar por observación directa el número de células.
296 Los microscopios utilizan cámaras de recuento con profundidad y área conocidas
297 junto con la ayuda de rejillas calibradas, por lo tanto, se puede calcular la
298 concentración de las células por unidad de volumen ²³. El reporte es el número de
299 células por mm³.

300 Nota 2: los recuentos en placa están asociados al concepto de membrana intacta por lo tanto, son células bacterianas que
301 son metabólicamente activas y que se dividen y crecen activamente en el medio de cultivo, en otras palabras son células
302 viables y cultivables.

303 Hay otros métodos microbiológicos en los cuales los analitos pueden ser metabolitos, material
304 genético o antígenos ²⁴. Por ejemplo, los que utilizan hibridación fluorescente *in situ* (FISH por sus
305 siglas en inglés) o la reacción en cadena de la polimerasa PCR que requieren consideraciones
306 especiales, dependiendo de la forma en cómo se hace la determinación del número de
307 microorganismos presentes; bien sea con una curva estándar para qPCR o ELISA o el recuento
308 microscópico directo en FISH ⁹.

309 También hay técnicas analíticas más recientes, como la citometría de flujo que es un sistema
310 automatizado, multi-paramétrico y cuantitativo que analiza las señales de luz dispersas y fluorescentes
311 producidas por una célula al pasar por un haz de luz y que permite diferenciar poblaciones celulares
312 simultáneamente, además de identificar y cuantificar células. Algunos métodos no incluyen una etapa
313 de confirmación por lo cual requieren de una confirmación externa usando, por ejemplo, kits de
314 identificación bioquímica, serotipificación, test de composición química (ejemplo, MALDI-TOF) o
315 pruebas moleculares. En cualquier caso, ésta etapa debe ser considerada dentro de la verificación/
316 validación del método ya que por un lado influencia el resultado de medida, y por el otro define el
317 microorganismo objetivo ⁹.

318

319 1.2.1 LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS BASADOS EN CULTIVO

320

321 La mayoría del trabajo en microbiología se basa en los métodos de cultivo de microorganismos que
322 permiten verificar la viabilidad de los mismos usando medios de cultivo para recuento o para
323 detección de él/los microorganismos objetivo ²⁵. El cultivo ha existido por más tiempo que otros
324 métodos de análisis microbiológicos y por eso se convirtieron en los métodos de referencia para
325 algunos analitos ²⁶, y por lo tanto, son los métodos convencionales que más se utilizan.

326 Así mismo, se reconoce que los métodos convencionales basados en crecimiento tienen limitaciones
327 como la reconocida imposibilidad de los métodos de cultivo para determinar el valor verdadero de
328 microorganismos viables en una muestra ²⁵, que han sido reconocidas con el avance tecnológico y el
329 mayor entendimiento científico ²⁷. Por ejemplo, los métodos basados en otras técnicas diferentes a
330 las de cultivo (marcadores celulares basados en crecimiento, en viabilidad, en ácidos nucleicos o en
331 ácidos grasos), son más adecuadas; porque pueden entregar información más sensible, precisa,
332 exacta, reproducible, para detección de células viables no cultivables (VBNC por sus siglas en inglés)
333 ²⁷.

334 Es importante mencionar que el estado VBNC de las células representa un problema para los análisis
335 de rutina en el laboratorio, la razón es que la viabilidad está asociada al metabolismo y a la membrana
336 intacta, por lo tanto, si no se detectan UFC, es porque están muertas o podría tratarse de VBNC donde
337 su metabolismo no ha permitido la proliferación²⁸. Esto podría incluir: la medición de la actividad
338 metabólica, la activación de la membrana, el contenido de ARN y/o ADN, la permeabilidad de la
339 membrana, etc. llegando a determinar la máxima viabilidad, degradación potencial y muerte²⁸.

340 Para comprender esta forma de estado celular, se puede resumir como la diferencia con una célula
341 muerta; estas últimas tienen una membrana dañada que no puede retener el ADN cromosómico y
342 plasmídico y son metabólicamente inactivas, mientras que las células VBNC tienen una membrana
343 intacta que contiene información genética intacta, se encuentran metabólicamente activas y realizan
344 respiración. Por otro lado, al comparar las VBNC con las células viables, las células VBNC tienen muchas
345 diferencias fisiológicas y moleculares con respecto a las células cultivables viables. Estas diferencias
346 incluyen la morfología celular, la composición de la pared y la membrana celular, el metabolismo, la
347 expresión génica, las resistencias físicas y químicas, las propiedades de adhesión y el potencial de
348 virulencia. En términos de morfología celular, una reducción en el tamaño de la célula es
349 probablemente una estrategia para minimizar los requisitos de energía. El estado de VBNC puede
350 revertirse mediante reanimación como la reversión del metabolismo y cambios fisiológicos que
351 caracterizan a las células VBNC²⁹.

352 Así las cosas, los métodos basados en cultivo para análisis microbiológicos implican múltiples pasos,
353 que incluyen: la preparación del medio, preparación del inóculo, la inoculación, posiblemente la
354 dilución en serie, la incubación, aislamiento e identificación y el recuento de colonias, cuando el
355 propósito es la cuantificación. El aspecto fundamental, que hace que esta metodología funcione, es la
356 multiplicación de esos microorganismos objetivo que han sido inoculados en medios de cultivo
357 apropiados e incubados en condiciones y tiempos adecuados²⁶.

358 1.2.1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

359

360 Los medios de cultivo pueden clasificarse principalmente por su consistencia física: sólidos, semisólidos
361 o líquidos y tienen presentaciones tales como medios preparados a partir de formulaciones
362 deshidratadas disponibles comercialmente, medio listos para su uso y medios preparados a partir de
363 componentes individuales básicos³⁰.

364 También se pueden clasificar dependiendo de la función que desempeñen^{13, 30}:

- 365 ● Enriquecimiento: cuya función es permitir el crecimiento de las células dañadas o injuriadas.
- 366 ● Selectivos: que contienen en la fórmula agentes selectivos que inhiben el crecimiento de
367 microorganismos acompañantes y permiten el crecimiento de un tipo de microorganismo
368 determinado.
- 369 ● Diferenciales: que permiten exhibir a los microorganismos reacciones diferentes frente a la
370 utilización de un sustrato en particular.
- 371 ● Transporte: para preservar y mantener la viabilidad de los microorganismos minimizando
372 cambios debido al tiempo entre la recolección de la muestra y el procesamiento.
- 373 ● Diluyente: para separar los microorganismos de un producto de prueba sólido en una fase
374 líquida y/o para reducir su concentración por dilución.
- 375 ● Aislamiento: permite el crecimiento de microorganismos objetivo específicos, mientras inhibe
376 total o parcialmente, otros microorganismos.
- 377 ● Identificación: produce una reacción de identificación específica que generalmente no
378 requiere ninguna prueba confirmatoria adicional.

- 379 ● Confirmación: contribuye a la identificación o caracterización de un microorganismo después
380 de una etapa preliminar (enriquecimiento, aislamiento).
381 ● Neutralizador: contienen ingredientes neutralizantes para inactivar detergentes,
382 desinfectantes u otros agentes biocidas.
383 ● Referencia: es un medio no selectivo, para la evaluación comparativa del desempeño
384 independiente de medio de cultivo bajo prueba y es usado como un control.

385 La clasificación de acuerdo con su composición puede ser:

- 386 ● Medios químicamente definidos
387 ● Medio químicamente indefinido o parcialmente indefinido
388 ● Medio de cultivo cromogénico
389 ● Medio de cultivo fluorogénico

390 Los métodos de ensayo convencionales, basados en cultivos para aislar, cultivar o enumerar el
391 microorganismo objetivo, se reconocen como los métodos analíticos de referencia para el control
392 oficial por parte de las autoridades reguladoras y se consideran el “método de referencia” en el
393 diagnóstico de alimentos o aguas para el comercio internacional y para las pruebas de conformidad
394 ²⁶.

395 1.2.1.2 MÉTODOS DE CULTIVO PARA RECuento O ENUMERACIÓN

396

397 Si el objetivo del análisis es determinar la concentración de microorganismos en la muestra, entonces
398 los métodos de cultivo pueden ser usados para enumerarlos, es decir para estimar el número de
399 microorganismos viables en la muestra analizada. Los conteos de viables se pueden asociar con
400 calidad, la vida útil o condiciones de inocuidad del producto muestreado ¹³. En otros casos, cuando
401 son alimentos fermentados con altas concentraciones de microorganismos propios de la muestra
402 (como es el caso de los cultivos probióticos), puede ser necesario contar con mucha precisión la
403 cantidad de células viables benéficas, ya que de esta manera es que son evaluados estos productos¹³.

404

405 En ocasiones, los ecosistemas microbianos en las muestras analizadas, así como los tratamientos
406 aplicados a los productos muestreados, pueden generar los estados celulares “viables no cultivables”
407 (VBNC), que van a requerir el uso de otras técnicas para una mejor estimación de los niveles de
408 contaminantes microbianos en las muestras. Los VBNC representan una clara amenaza para la
409 seguridad alimentaria, ya que el uso de análisis microbiológicos tradicionales basados en cultivos
410 podría dar lugar a una subestimación o una interpretación errónea del estado microbiano del producto
411 ³¹.

412 La técnica estándar para recuento de microorganismos es el recuento en placa que puede ser realizada
413 en profundidad o superficie y que permite contar microorganismos aerobios y aerobios facultativos.
414 Hay otras técnicas en medios líquidos, como el Número Más Probable (NMP) ²⁶ y el recuento directo
415 de células usando microscopía o con citometría de flujo.

416 Los recuentos de colonias viables se basan comúnmente en el número de colonias que se desarrollan
417 en una placa de agar (medio sólido) que han sido previamente inoculadas con cantidades conocidas
418 de suspensiones diluidas de la muestra e incubadas en condiciones ambientales determinadas ³². Para
419 los análisis microbiológicos tradicionales, la característica viable cultivable está relacionada con la
420 propiedad de membrana intacta que hace posible la evidencia de la colonia en la placa de agar. Las
421 etapas de dilución son un requerimiento básico para la enumeración de microorganismos, de manera

422 que se puedan alcanzar poblaciones contables en las cajas de Petri, idealmente entre 25 y 50 UFC.
423 Para alcanzar esta concentración se hacen diluciones seriadas, generalmente 1:10. Se hacen tantas
424 diluciones como sean necesarias para poder contar las UFC en las cajas de Petri ¹³.

425 De otro lado, el método del número más probable (NMP), es un ensayo estadístico de múltiples pasos
426 que consta de fases presuntivas, confirmativas y complementarias. Por lo tanto, a diferencia del
427 recuento de aerobios en placa, el NMP no proporciona una medida directa del recuento bacteriano,
428 es decir no es una medida precisa. El NMP es particularmente útil para concentraciones bajas de
429 organismos (<100/g), especialmente en leche y agua, y para aquellos alimentos cuyas partículas
430 pueden interferir con el recuento exacto de colonias²². En el ensayo, se inoculan diluciones seriadas
431 de una muestra en medio líquido. Se cuentan los tubos positivos (cambio de color, gas, fluorescencia)
432 a partir de los cuales se realizan las otras fases del ensayo según el método, y luego utilizan las
433 combinaciones de resultados positivos para consultar una tabla estadística y así estimar el número de
434 organismos ³³.

435 La automatización de los métodos de enumeración basados en cultivo reduce el tiempo necesario
436 para realizar estos procedimientos analíticos, además han permitido reducir las necesidades de mano
437 de obra, el costo de los materiales y mejorar el rendimiento ²⁶. Las máquinas de preparación de agar,
438 los diluidores automáticos, los dispositivos de recuento y los dispositivos de placa en espiral para el
439 esparcido, son algunos ejemplos de equipos que han hecho posible que los laboratorios procesen más
440 muestras con mayor eficiencia ²⁶.

441

442 1.2.1.3 MÉTODOS DE CULTIVO PARA DETECCIÓN

443

444 Los métodos de cultivo de detección permiten determinar la prevalencia de los patógenos en la
445 muestra. La detección en medios de cultivo líquido puede observarse como un cambio de color o de
446 conductividad, impedancia y turbiedad en el caldo de cultivo. En medios de cultivo sólidos (agar) las
447 UFC visibles indican crecimiento de células. La apariencia de los indicadores de crecimiento, es
448 suficiente para que una persona competente pueda deducir la presencia de microorganismos viables
449 en la muestra ²⁶.

450 Estos métodos constan de cuatro etapas: enriquecimiento; que puede incluir un enriquecimiento
451 selectivo, screening (pruebas de detección), aislamiento y confirmación. Se explica brevemente cada
452 etapa.

453 El enriquecimiento, también llamado pre-enriquecimiento, es el primer paso del cultivo y el objetivo
454 es permitir la amplificación de la concentración del patógeno, sobretodo con la recuperación de
455 microorganismos dañados o estresados (resucitación). Se realiza en medios líquidos donde se
456 introduce la muestra y se lleva a incubación a la temperatura óptima de crecimiento. En esta etapa se
457 resuelven algunos desafíos: convierte las muestras sólidas en suspensiones acuosas, aumenta la
458 concentración del microorganismo objetivo y homogeniza la distribución. Además, asegura que el
459 éxito en las etapas siguientes de screening y aislamiento, no dependa de la probabilidad de que las
460 alícuotas de la suspensión de la muestra contengan el patógeno objetivo ¹⁶. Asimismo, para detectar
461 la presencia de células con daños, en mayor o menor grado, que pueden ser provocados por
462 calentamiento, congelación, deshidratación, irradiación, acidificación, exposición a agentes
463 desinfectantes, entre otros, es necesario introducir una etapa de revitalización o enriquecimiento ³².

464 El enriquecimiento selectivo, que procede al anterior, promueve el desarrollo del microorganismo
465 objetivo mientras que suprime o inhibe el desarrollo de los microorganismos competidores y flora
466 acompañante, por ende la selectividad del medio está provista de agentes o condiciones las cuales
467 son antagonistas o inhibitorias de la flora acompañante. Estos agentes selectivos incluyen por
468 ejemplo, temperatura, condiciones de pH, antibióticos, sales, ácidos y metales ³⁴.

469 La siguiente etapa puede ser el screening que va seguida del aislamiento. Las pruebas de screening,
470 en el caldo de enriquecimiento no son obligatorias, se hacen para detectar la presencia de moléculas
471 o de secuencias de genes del patógeno en cuestión, pero el objetivo del screening es reducir el número
472 de muestras que necesitan continuar a la etapa de aislamiento, separando aquellas negativas para el
473 patógeno. La finalidad de esta etapa no es la detección del patógeno en sí, ya que el caldo de
474 enriquecimiento contiene una población mixta y se pueden producir falsos positivos que van a ser
475 eliminados durante la etapa de aislamiento, la cual sí es obligatoria ¹⁶. Generalmente, estas pruebas
476 corresponden a técnicas cualitativas rápidas para detectar presuntivamente un microorganismo
477 objetivo.

478 Posteriormente está la etapa de aislamiento que como se mencionaba, es obligatoria y busca
479 establecer un cultivo puro del patógeno de interés con UFC aisladas y separadas de los
480 microorganismos acompañantes, de manera que no puedan provocar interferencia en la
481 interpretación de los resultados durante la identificación (que será abordada en el numeral 1.2.2) ¹⁶.
482 La etapa de aislamiento comienza con un primer aislamiento en un medio de cultivo selectivo
483 intentando obtener cultivos puros (aunque también pueden ser cultivos mixtos) y la misma se
484 completa al conseguir un cultivo puro tras un segundo (o más) aislamiento para obtener colonias puras
485 presuntivas separadas del patógeno de interés en medio de cultivo no selectivo ¹⁶.

486 Finalmente, a los cultivos no selectivos, aislados y puros se les efectúan las pruebas de identificación
487 y confirmación. Los resultados de estos métodos se informan como ausencia/presencia o detectado
488 /no detectado del microorganismo de interés en la porción de muestra analizada.

489

490 1.2.2 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN O DE CONFIRMACIÓN

491

492 Una tarea fundamental de los laboratorios de microbiología es la identificación de los
493 microorganismos asociados con infecciones en humanos o animales, asociados a procesos clínicos de
494 infección y enfermedad. Un pilar primordial es la asignación de especie a un aislamiento microbiano
495 ³⁵.

496 Como se mencionó anteriormente, la confirmación es importante cuando se estiman parámetros de
497 desempeño como falsos positivos o falsos negativos, sensibilidad y especificidad, especialmente en
498 los métodos cualitativos, porque esta etapa confirma o rechaza los resultados obtenidos con el
499 método evaluado⁹.

500 Una vez las colonias de los presuntivos han sido aisladas, se procede con la etapa de la confirmación
501 o identificación a los sub-cultivos purificados, a los cuales se aplica un método para confirmar la
502 identidad del microorganismo, el cual generalmente es el patógeno de interés. Los métodos de
503 confirmación pueden ir desde confirmación al nivel de familia y género, hasta métodos para
504 confirmación / tipificación a nivel de género, especie y de serovares ³⁶. Hay varios métodos de
505 identificación o confirmación, pero los más usados son: los de identificación fenotípica o tradicional y
506 serotipificación, los métodos genotípicos y los métodos basados en proteómica ³⁵. Cada uno de los

507 métodos escogidos tienen diferente sensibilidad, lo cual es determinante para la correcta asignación
508 de la identidad del presuntivo y que, a su vez, va a repercutir en la sensibilidad del método analítico
509 bajo estudio.

510 Los métodos tradicionales fenotípicos, se basan fundamentalmente en la comparación de las
511 características fenotípicas (observables como morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas y
512 metabólicas) de bacterias desconocidas con aquellas de cultivos tipo (de referencia). Es de gran
513 relevancia la experiencia del microbiólogo, encargado de la elección de la o las pruebas, la ejecución
514 de manera secuencial de las mismas, así como la interpretación de los resultados³⁵. En ningún caso,
515 los métodos de identificación fenotípica pueden proporcionar una certeza absoluta, únicamente
516 indicarán cuál es el género y/o la especie a la que el microorganismo identificado tiene mayor
517 probabilidad de pertenecer ³⁵.

518 Los métodos genotípicos, por su parte, permiten superar las limitaciones de los métodos fenotípicos
519 (por ejemplo, no todas las cepas de una misma especie presentan características homogéneas)
520 identificando genes conservados para establecer relaciones entre bacterias y genes que permitan
521 mayor diferenciación intra-especies en grupos, biovariedades, genovariedades, etc.³⁵. Estos métodos
522 genotípicos se basan en la amplificación genómica y/o en la secuenciación de esos genes o sus
523 fragmentos y son muy usados cuando hay dificultades con el aislamiento, crecimiento lento, baja
524 actividad en las pruebas bioquímicas, baja efectividad en las pruebas serológicas, entre otras. Además,
525 permiten obtener resultados reproducibles y en ocasiones más rápidos que los tradicionales ³⁵.

526 El otro grupo de métodos son los proteómicos, se basa en el estudio y la caracterización de un
527 conjunto de proteínas expresadas por el microorganismo bajo estudio. Según el objetivo del estudio,
528 hay técnicas para analizar globalmente el proteoma, como la electroforesis, técnicas para analizar
529 individualmente las proteínas, como espectrometría de masas (Ejemplo MALDI-TOF)³⁵, los
530 inmunoensayos, entre otros.

531

532 1.3 EL MATERIAL DE REFERENCIA EN MICROBIOLOGÍA

533

534 Un material de referencia (MR) se define como un material suficientemente homogéneo y estable con
535 respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o
536 en un examen de propiedades cualitativas (VIM 5.13), por otro lado, un material de referencia
537 certificado (MRC) corresponde a un material de referencia acompañado por la documentación emitida
538 por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con
539 incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos (VIM 4.14). Los valores
540 de propiedad se obtienen a través de la caracterización como se describe en las Guías ISO 17034:2016
541 y ISO Guide 35: 2017 ³⁷.

542 Si bien es cierto que en el campo de las mediciones en física y química es donde existen MR y MRC
543 bien entendidos y caracterizados, las necesidades de garantizar la comparabilidad de los resultados
544 de medición en diferentes campos, entre ellos microbiología, ha hecho necesario el desarrollo de
545 materiales que garanticen dicha comparabilidad. Sin embargo, en microbiología se presentan algunos
546 desafíos adicionales, teniendo en cuenta que los analitos de interés son organismos vivos, por lo que,
547 como se ha mencionado previamente, las referencias de medición deben estar orientadas a garantizar
548 las características de la identidad del microorganismo (en el caso de ensayos cualitativos) y de cantidad
549 o concentración (en el caso de ensayos cuantitativos). A continuación, algunas definiciones para
550 ampliar el entendimiento de estas características en microbiología ³⁸:

- 551 1. Cepa: células que descienden de un único aislamiento de un cultivo puro, por lo general a
552 partir de una sola colonia, aunque no necesariamente de una sola célula (es decir, no
553 necesariamente un clon).
- 554 2. Autenticación: proceso de comparación de las características de una cepa para determinar o
555 verificar la identidad.
- 556 3. Identidad: es la identificación de un microorganismo y proporciona el nombre del
557 microorganismo (a nivel de género o especie)
- 558 4. Caracterización o tipificación: esto agrupa organismos que comparten patrones de
559 fragmentos de ADN o perfiles antigénicos similares. Es el proceso de someter una cepa a una
560 serie de pruebas morfológicas, fisiológicas, moleculares o/y otras.
- 561 5. Cantidad: es la enumeración o recuento del microorganismo (directo/ indirecto. Individual o
562 en masa)

563 Al igual que con los MR físicos o químicos, se requiere que los MR microbiológicos sean adecuados
564 para: i) demostrar la exactitud de los resultados de medición, ii) calibrar equipos de laboratorio, iii)
565 monitorear el desempeño del laboratorio, iv) validar métodos, v) permitir la comparación de métodos,
566 vi) demostrar la calidad de los medios de cultivo o vii) demostrar el desempeño de los kits de ensayo¹⁸.

567 En microbiología, los MR son las cepas o cultivos de referencia que provienen de colecciones de
568 microorganismos certificadas, las colecciones de cultivos microbianos se centran en la adquisición,
569 autenticación, producción, conservación, catalogación y distribución de cultivos viables de
570 microorganismos de referencia, líneas celulares y otros materiales para la investigación. La colección
571 de cultivos también son depósitos de cepas tipo. Estas colecciones deben estar reconocidas y
572 registradas como miembro de la Federación Mundial de Colección de Cultivos (WFCC) o de la
573 Organización de Colecciones de Cultivo Europea (ECCO), las cuales garantizan que el material esté bien
574 caracterizado en diferentes niveles (género, especie, subespecie e incluso serotipo), catalogado y
575 descrito acorde con sus características³⁹. La WFCC es una comisión multidisciplinar de la Unión
576 Internacional de Ciencias Biológicas (UICB) y una federación dentro de la Unión Internacional de
577 Sociedades de Microbiología (IUMS). La WFCC se ocupa de la recogida, autenticación,
578 mantenimiento y distribución de cultivos de microorganismos y células cultivadas. Su objetivo es
579 promover y apoyar la creación de colecciones de cultivos y servicios relacionados, proporcionar un
580 enlace y establecer una red de información entre las colecciones y sus usuarios, organizar talleres y
581 conferencias, publicaciones y boletines informativos y trabajar para garantizar la perpetuación a largo
582 plazo de las colecciones importantes³⁸.

583 La trazabilidad (referida a la rastreabilidad) de estos materiales está dada hacia la identidad del
584 microorganismo, que es una propiedad cualitativa. Por lo anterior, el MR es trazable al cultivo de
585 origen (cultivo de colección), el cual posee una identidad confirmada (genotípica y fenotípica),
586 características bien definidas, así como una cadena de custodia totalmente documentada. Cuando no
587 se dispone de cultivos de referencia trazables, es posible emplear derivados comerciales trazables a
588 estos, siempre y cuando las propiedades relevantes para el uso previsto hayan sido demostradas
589 equivalentes por el laboratorio¹⁸.

590 Cuando la trazabilidad metrológica no es técnicamente posible al sistema internacional de unidades
591 (SI) , como es el caso de microbiología, la forma de satisfacer satisfactoriamente este requerimiento
592 es: a) usando valores certificados de materiales de referencia certificados producidos por proveedores
593 competentes, b) documentar los resultados de la medición a métodos de referencia adecuados,
594 específicos o definidos por consenso que entreguen resultados ajustados al uso previsto. (la evidencia
595 de comparación de esta medición será solicitada por el organismo de acreditación competente)⁴⁰.

596 Se considera que la trazabilidad de una medición microbiológica se puede demostrar de manera
597 indirecta a través de la trazabilidad de los equipos empleados y del aseguramiento de la calidad de los
598 resultados, a través del uso de cepas de referencia o cultivos de colecciones microbiológicas de
599 referencia.

600 Las cepas de referencia son necesarias para demostrar que los medios poseen unas características
601 aceptables, para validar métodos y para controlar que se mantienen sus características. La trazabilidad
602 es necesaria, por ejemplo, al establecer las características de los medios utilizados en kits de análisis
603 y validaciones de métodos. Para demostrar la trazabilidad, el laboratorio debe utilizar cepas de
604 referencia de microorganismos obtenidos directamente de una colección nacional o internacional
605 reconocida, cuando exista alguna. Alternativamente también podrían utilizarse cepas comerciales
606 siempre que el laboratorio pueda demostrar en el momento de su uso que todas las propiedades
607 relevantes son equivalentes ¹⁸.

608 Por otro lado, los MRC empleados en ensayos cuantitativos, disponen de un valor de concentración
609 (usualmente en UFC) y una incertidumbre declaradas, estos pueden ser caracterizados para identidad
610 y cantidad (concentración), esta última la puede hacer el proveedor con sus métodos de ensayo, o a
611 partir de ejercicios interlaboratorio donde el valor de consenso, posterior al tratamiento estadístico,
612 corresponde al valor asignado. La trazabilidad en este caso, sí se denomina trazabilidad metrológica y
613 está dada al procedimiento de medición empleado para la asignación del valor del material ⁴¹. La
614 trazabilidad metrológica es una característica de un resultado de medición y consta de dos partes: la
615 identidad claramente definida del mensurando y la trazabilidad de los valores de propiedad de ese
616 mensurando. Por lo tanto, establecer la trazabilidad incluye tanto la prueba de identidad de la
617 propiedad medida como la comparación de los resultados con una referencia declarada apropiada. La
618 comparación se establece asegurando que los procedimientos de medición se validen de manera
619 adecuada, que el equipo de medición se calibre de manera adecuada y que las condiciones de
620 medición (como la preparación del material de prueba, las condiciones ambientales, etc.) estén bajo
621 control suficiente para proporcionar un resultado confiable ⁴².

622 Todos los materiales deben venir acompañados de un documento, en el caso de los MR no certificados
623 es una hoja de información y en el caso de los MRC es el certificado. La mínima información que debe
624 contener el certificado de acuerdo con la Guía 31 es ⁴³: i) Nombre del material, donde generalmente
625 se debe especificar la identidad del microorganismo, ii) Código y número de lote, iii) Valor certificado
626 y su incertidumbre, iv) uso previsto, v) instrucciones de uso, vi) métodos analíticos empleados en su
627 caracterización, vii) trazabilidad, entre otros. Para información detallada del certificado revisar ISO
628 Guide 31 de 2000.

629 Nota: no todos los productores de material de referencia siguen los lineamientos de las guías relacionadas, por
630 lo que aún se encuentra una heterogeneidad en la información que presentan en sus certificados.

631 Existen otras alternativas, en relación con el acceso a materiales que se pueden emplear como control
632 de calidad, o en los procesos de validación pueden ser:

- 633 ● *Ítems de ensayo provenientes de ensayos de aptitud o ejercicios interlaboratorio*, que le
634 permite comparar los resultados del laboratorio contra el valor asignado para el ítem de
635 ensayo en el ensayo de aptitud, empleando el mismo método de ensayo para evitar sesgos no
636 corregidos por diferencias en los métodos de medición.
- 637 ● Muestras fortificadas con cantidades conocidas de cepas / cultivos de referencia.
- 638 ● Materiales de referencia in house: aquellos preparados por el laboratorio, donde se ha
639 demostrado que son lo suficientemente homogéneos y estables para ser empleados como
640 herramientas de control de la calidad en el flujo de trabajo del laboratorio ⁴⁴.

641

642 Sin embargo, vale la pena aclarar que los MRC son producidos por productores de materiales de
 643 referencia establecidos y están disponibles comercialmente, los materiales para control de calidad
 644 (MCC) se suelen preparar por un laboratorio para su propio uso interno. Con frecuencia, los MCC se
 645 caracterizan sólo para un alcance limitado (un número limitado de valores de propiedad) y para
 646 aplicaciones específicas del laboratorio. Dichos materiales no requieren una caracterización mediante
 647 procedimientos metrológicamente válidos, y se pueden preparar “internamente” (*in-house*), es decir,
 648 por personal del laboratorio familiarizado con su comportamiento, para cumplir con los requisitos
 649 específicos del control de calidad.

650 En relación con la disponibilidad de MR/MRC microbiológicos, existen diferentes bases de datos que
 651 se relacionan en la tabla (ver tabla 1.1) a continuación:

Nombre de la base de datos	Descripción	Sitio web
La División Técnica de Materiales de Referencia (TDRM por sus siglas en inglés)	Filial de AOAC, dispone de una base de datos con MR provenientes de Institutos Nacionales de Metrología así como productores acreditados en ISO 17034	http://tdrmdb.aoac.org/
Código de Indexación de Materiales de Referencia – COMAR (por sus siglas en francés)	Es una de las bases más grandes, creada por el Laboratorio Nacional de Metrología francés en 1970, actualmente administrada por el Instituto Federal de Investigaciones y Ensayo de Materiales (BAM) alemán. Dispone de un listado de más de 7000 materiales de referencia indexados por nombre, descripción, propiedades físicas, convencionales, campos de aplicación, forma y composición. La consulta en la base de datos requiere de un registro previo	https://rrr.bam.de/RRR/Navigacion/EN/Reference-Materials/COMAR/comar
El Centro de Investigación adjunta (JRC por sus siglas en inglés) de la Unión Europea	dispone de un listado de más de 800 MRC producidos por este centro, entre los cuales se encuentran varios MRC microbiológicos, a nivel de identidad así como para propiedades cuantitativas.	https://crm.jrc.ec.europa.eu
FAPAS	Uno de los proveedores de programas de ensayos de aptitud (EA) más reconocidos a nivel mundial dispone de un catálogo de materiales de referencia y materiales control de calidad, los primeros con incertidumbres y trazabilidades establecidas, los segundos a partir de los materiales empleados en diferentes EA, donde disponen de un valor asignado y un intervalo de desempeño en términos de Z score.	https://fapas.com/shop/browse/2
La Oficina de Referencia Alemana para Ensayos de Aptitud y Materiales de Referencia (DRRR por sus siglas en Alemán)	Ofrece materiales de referencia similares a los controles de calidad de FAPAS, producto de los ítem de ensayo empleados en los Ensayos de Aptitud ofrecidos.	https://drrr.de/en/referencematerials/microbiology/
LGC Standards es una división de LGC Group	de LGC Group que es el Instituto Nacional designado del Reino Unido para mediciones químicas y bioanalíticas. Son fabricantes y proveedores de servicios de herramientas de investigación y para control de calidad como materiales de referencia y ensayos de aptitud. Son materiales acreditados según ISO 17034.	https://www.lgcstandards.com/PL/en/Food-and-Beverage/Microbiology/catt/279643
Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC por sus siglas en inglés)	dispone de un listado de MR a nivel tanto de los microorganismos como de metabolitos de interés como los son ácidos nucleicos.	https://www.atcc.org/microbe-products/collections-and-projects/certified-reference-materials?matchtype=&network=g&device=c&adposition=&keyword=&gclid=CjwKCAiA24SPBhB0EiwAjbG

		khlijdFNUdQ2NErydTO6Fsl17u0HC576PjMWVwZ0ZAwSsZ2rgmWulfwhoC-fgQAvD_BwE#t=productTab&numberOfResults=24
La Agencia Nacional de Alimentos de Suecia.	Ofrece servicios de Ensayos de Aptitud y Materiales de Referencia	https://www.livmedelsverket.se/en/business-legislation-and-control/laboratory-activities-and-scientific-support/microbiological-reference-materials#Reference_material_Food
EL Comité Adjunto para Trazabilidad en Laboratorios Clínicos (JCTLM por sus siglas en inglés)	Dispone de una base de datos con Materiales de referencia, métodos de medición y servicios de medición orientados a los laboratorios clínicos, aunque no se listan MR microbiológicos, disponen de MR aplicables a nivel de química clínica que eventualmente podrían emplearse para estudios de comparación.	https://www.bipm.org/jctlm/home.do
NSI Lab Solutions	Productor de Materiales de referencia certificados (CRM) para química y microbiología de alimentos: materiales de referencia cultivos de patógenos (STEC, <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i>), indicadores microbiológicos CRM para métodos Petrifilm™ y BAM y materiales de referencia para alérgenos. Hisopos de cultivo SNAP-Stick™. Programa acreditado de pruebas de competencia en química y microbiología de alimentos ISO 17043.	https://www.nsilabsolutions.com/product-category/food/microbiological-food/single_strain_crm-microbiological-food/
Institutos nacionales de metrología	con capacidad para desarrollar materiales de referencia de ésta naturaleza	
Instituto Nacional de Tecnología Industrial de Argentina- INTI	El Laboratorio Nacional de Referencia y su Sistema Integrado conformado por el Sistema Centralizado de Calibración (SICECAL) y la Red Argentina de Laboratorios Lácteos de Calidad Asegurada (REDELAC), proveen a los laboratorios distintas herramientas y servicios para el aseguramiento de la validez de los resultados. El SICECAL es nuestro sistema de producción de materiales de referencia (MR) y materiales de referencia certificados (MRC) en distintas matrices	https://www.inti.gob.ar/areas/metrologia-y-calidad/metrologia-quimica/sicecal/mrc-mr
Biosisto	Biosisto es un laboratorio designado del gobierno para la Autoridad de Seguridad de Alimentos y Productos de Consumo del Gobierno Holandés. Se centra en la producción de material de referencia microbiológico (RM), materiales de referencia certificados (CRM) y un sistema de software de análisis en línea (BiosistoChart) utilizado por laboratorios de alimentos, lácteos y agua para fines de control de calidad.	https://www.biosisto.com
Proveedores comerciales	quienes distribuyen MR y controles de calidad provenientes de productores acreditados	
Merck (Sigma Aldrich)	Distribuye discos VITROIDS™ y LENTICULE® de Supelco® que están especialmente desarrollados para controles microbiológicos. Tiene licencia de la Colección Nacional de Cultivos Tipo (NCTC®)/Colección Nacional de Hongos Patógenos (NCPF®) y la Colección de Cultivo Tipo Española (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT®).	https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/products/analytical-chemistry/reference-materials/microbiology-standards?gclid=CjwKCAiA24SPBhB0EiwAjBgkhu80jKvGRP1bFnkS2TGihBgmZY6SwoH9JJxEnH_P66ExJNMi

		mVjrcRoCX4oQAvD_BwE#bacteria
Microbiologics	Distribuye MR y MRC. Epower® MRC viene con un certificado de análisis integral que detalla la identidad, las características y la desviación estándar de las cepas.	https://www.microbiologics.com/item-type/Product/product-format/Epower-CRM
Emerald scientific	Distribuye MR y MRC proveniente de NSI Lab Solutions y The Emerald Test™, y el programa de prueba de competencia de comparación entre laboratorios desarrollado específicamente para laboratorios de prueba de cáñamo y cannabis	https://emeraldscientific.com/reference-materials/microbiology/certified-reference-materials/
Colección nacional de cultivos Tipo (NCTC) del Reino Unido	Dispone de un listado de MR procariotas, DNA bacteriano, bacteriófagos, entre otros.	https://www.culturecollections.org.uk/products/index.aspx

652

653 1.4 CONSIDERACIONES PARTICULARES DE LA MEDIDA EN MICROBIOLOGÍA

654

655 Al igual que otros procesos de medida, en microbiología hay algunas características particulares que
656 deben ser consideradas al momento de medir:

657 1.4.1 Naturaleza del analito: El analito u objeto de medida o examen es un ser vivo, cuya implicancia
658 en una muestra de alimento por ejemplo, constituye un riesgo para la salud de las personas si
659 es clasificado como un microorganismo patógeno, productor de toxinas que puede provocar
660 una enfermedad transmitida por los alimentos o es microorganismo indicador de inocuidad
661 que afecta principalmente a la calidad y vida útil de alimento ya sea deteriorando o
662 produciendo cambios no deseables. Es por ello, por lo que se deben considerar algunas
663 particularidades, por ejemplo: taxonomías imprecisas que pueden conducir a la separación o
664 agrupamiento impreciso de microorganismos (desde el punto de vista taxonómico); el
665 comportamiento de los individuos de un grupo, ya que generalmente se evalúan los individuos
666 con comportamientos típicos pero no se debe obviar la existencia de los individuos no típicos;
667 dificultades para garantizar la estabilidad de las muestras por largos periodos de tiempo,
668 debido tanto al crecimiento o a la muerte de los microorganismos en las muestras; la
669 presencia o ausencia de microorganismos acompañantes en las muestras; las concentraciones
670 pequeñas de microorganismos en las muestras y la distribución de estos ⁴⁵, además, de la
671 considerable capacidad de variaciones genéticas y mutaciones ²⁴, entre otras.

672
673 1.4.2 Distribución de la población: La distribución de los microorganismos no es uniforme, es decir,
674 es heterogénea, caracterizándose como una distribución de Poisson. Dada la dificultad de
675 realizar recuentos por encima de 300 UFC (ver ISO 7218), es necesario garantizar una
676 concentración inferior en las placas de cultivo, sin embargo, los recuentos en microbiología
677 no siempre tienen una distribución normal, así que, para obtener una distribución más
678 cercana a la normal, los recuentos son transformados a logaritmo decimal ¹. Para conteos
679 pequeños (<20 UFC), no es aplicable el modelo de distribución normal, por lo que se requiere
680 aplicar funciones de distribución de Poisson o binomial negativa⁴⁶, lo que hace necesario el
681 uso de tratamientos estadísticos diferentes para establecer valor de población y sus límites de
682 confianza. En lo posible, la ISO 13843 recomienda que independientemente del método de
683 preparación de las muestras, se debe prestar atención a la práctica de homogeneización para
684 facilitar la distribución aleatoria de los microorganismos en la muestra ⁹.

685

Distribución espacial (relativa al azar uniforme)	Distribución de frecuencias (relativa a Poisson)			Ejemplo
Más espaciado (casi regular)	más concentrado	sub-dispersión	varianza < media	Un patrón de contaminación regular puede ser el resultado de eventos de contaminación en el proceso de producción, por ejemplo, un cabezal de llenado contaminado. Como consecuencia, la contaminación regular se caracteriza por una alta prevalencia de unidades contaminadas en el lote y una baja variabilidad en la concentración.
Uniforme aleatorio	Poisson		varianza = media	Un patrón de contaminación aleatorio suele ser el resultado de una mezcla completa o cuando los eventos de contaminación ocurren al azar (contaminación homogénea)
Más agrupado	más sesgado a la derecha	sobre-dispersión	varianza > media	Un patrón de contaminación agrupada puede ser el resultado de un evento de contaminación seguido de cierto crecimiento del organismo y mezcla limitada del producto. Como resultado, las células individuales no se distribuyen ampliamente a través de los alimentos. Como consecuencia, la prevalencia de unidades contaminadas en el lote puede ser baja y la variabilidad en la concentración puede ser alta

687

688

689

690

691

692

693

694

695

1.4.3 Sistemas de detección: En los métodos de ensayos microbiológico, el sistema de detección está definido por los medios de cultivo (detectores) y, en ocasiones, estos pueden presentar resultados inesperados causados por los organismos vivos o pueden ser provocados por efectos de la matriz, por ingredientes del sustrato de crecimiento o por los microorganismos acompañantes. Los microbiólogos deben ser capaces de reconocer y entender estos cambios en los medios de cultivo ⁴⁶, de allí que es obligatorio evaluar el desempeño de los detectores ³⁰ y es aconsejable conocer el efecto de las matrices para disminuir esas interferencias. Otro

696 punto importante, es tener presente que cuando el número de microorganismos es muy bajo,
697 no es la capacidad del método para detectar el microorganismo lo que determina el resultado
698 del ensayo, sino la probabilidad de que una célula estuviera realmente presente en la unidad
699 analítica analizada, por ende independiente de la homogeneización, la selección de una
700 alícuota implica un elemento de aleatoriedad y, por lo tanto, una probabilidad de que se
701 encuentre un número diferente de organismos en cada muestra o submuestra.

702 1.4.4 Muestreo o toma de muestra: Etapas anteriores a la medición, como el muestreo o toma de
703 muestra, han demostrado que influyen fuertemente sobre los resultados de los análisis, por
704 ejemplo, los microorganismos patógenos son difíciles de detectar porque se encuentran en
705 bajas concentraciones, tienen una distribución heterogénea en la muestra y en algunos casos
706 pueden estar dañados o estresados a causa de las condiciones de producción de los alimentos
707 o de tratamientos aplicados a la muestra. Esta es la principal razón para someter las muestras
708 a etapas de “enriquecimiento” o “revitalización” que mejoren la detección y es anterior a las
709 etapas de enumeración, si es el caso ¹³. El muestreo y transporte debe ser realizado
710 apropiadamente, las muestras de laboratorio deben ser representativas del lote entero,
711 deben protegerse contra la contaminación externa y el manejo inadecuado, especialmente a
712 las temperaturas que pueden alterar significativamente la microbiota. Las muestras
713 recepcionadas en el laboratorio deben ser analizadas dentro de los tiempos establecidos
714 según el tipo de producto ³⁴.

715
716 1.4.5 Reporte de resultados: En el caso de los métodos cualitativos, el resultado se informa cómo
717 detectado o no detectado, en el caso de los métodos cuantitativos son las Unidades
718 Formadoras de Colonia (UFC) o el Número más Probable (NMP). Las unidades deben referir a
719 una unidad de volumen (mL) o de masa (g) según corresponda. Estos son en realidad una
720 aproximación al número de unidades reales de la muestra, a diferencia de los métodos
721 directos como microscopía o citometría de flujo que cuentan células individuales; Células de
722 Bacteria Individuales (IBC por sus siglas en inglés), y donde los resultados se expresan como
723 número de bacterias (células) por gramo o mililitro o por unidad de muestra ⁴⁹. Sin embargo,
724 no hay un consenso aún sobre una equivalencia entre UFC y Células por unidad de volumen,
725 que contribuya a armonizar los resultados obtenidos por diferentes técnicas, los resultados
726 son método dependientes, y que obliga a hacer trazables los resultados de medición a un
727 procedimiento de medición antes que a una referencia más general, como una unidad del
728 Sistema Internacional.

729

730 CAPÍTULO 2 - ADECUACIÓN DE USO DE LOS MÉTODOS 731 MICROBIOLÓGICOS.

732

733 La adecuación de uso de los métodos está relacionada con el grado en que los requisitos analíticos
734 establecidos y las características de desempeño evaluadas permiten garantizar el cumplimiento del
735 propósito definido para el método de ensayo, por ejemplo, frente a los requisitos de un cliente.

736 En general, la guía de adecuación de uso de los métodos analíticos plantea seis principios que vale la
737 pena recordar ⁸:

- 738 1. Las medidas analíticas deberían realizarse para satisfacer un requisito acordado” (ej.: con un
739 objetivo definido).
- 740 2. Las medidas analíticas deberían realizarse con métodos y equipos que previamente han sido
741 probados para asegurar su adecuación al uso.
- 742 3. El personal que realiza medidas analíticas debería estar calificado y ser competente para
743 realizar sus tareas (y demostrar que pueden realizar correctamente los análisis).
- 744 4. Debería existir una evaluación periódica e independiente del desempeño técnico de un
745 laboratorio.
- 746 5. Las medidas analíticas realizadas en un lugar deberían ser consistentes con las realizadas en
747 otros lugares.
- 748 6. Las organizaciones que realizan medidas analíticas deberían definir procedimientos
749 adecuados de control y de aseguramiento de calidad.

750 En el caso de los ensayos microbiológicos, el propósito generalmente está dirigido a la detección,
751 identificación y/o cuantificación de un microorganismo o conjunto de microorganismos, a nivel de
752 género, especie o serotipo. Por lo tanto, antes de aplicar un método de ensayo, es necesario garantizar
753 que se cumplen los requisitos analíticos con la evaluación de los parámetros y características de
754 desempeño y demostrar así, que el método es adecuado para el uso que va a tener en el laboratorio
755 y cumplir con los requisitos del cliente ¹⁵.

756 En este sentido, antes de que un método pueda ser usado en el laboratorio, con el objeto de producir
757 resultados confiables y adecuados para el propósito⁵⁰, se requiere realizar la validación o la
758 verificación del método (Tabla 2.1).

759 Tabla 2.1: Definiciones de validación y verificación

	VIM ¹¹	ISO 16140 ²	FDA ⁶
Validación	<i>Una verificación que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto (2.45)</i>	<i>El establecimiento de las características de desempeño de un método y la aportación de evidencia objetiva que los requisitos de desempeño para un uso previsto se cumplen (2.81)</i>	<i>Confirmación por examinación y provisión de evidencia objetiva de que los requisitos particulares para el uso previsto se han cumplido (1.6)</i>
Verificación	<i>La aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados (2.44)</i>	<i>La demostración que el desempeño del método validado, en el laboratorio del usuario, está de acuerdo con las especificaciones determinadas en el estudio de validación y que se ajusta al propósito del uso previsto (2.83)</i>	<i>Confirmación por examinación y la provisión de evidencia objetiva que los requisitos especificados para el desempeño de un método se han cumplido por un laboratorio individual. (4.1.2)</i>

760

761 Si bien el lenguaje es diferente, es claro que la validación como primera etapa, está dirigida a
762 establecer los requisitos analíticos que van a definir las características de desempeño que el método
763 debe estar en capacidad de cumplir para cubrir los requisitos especificados o el fin previsto, y una vez
764 comprobados, constituirán esa evidencia objetiva requerida. Por otro lado, la verificación, como
765 segunda etapa, sólo puede ser aplicada sobre métodos que ya han sido validados, obedece a

766 demostrar su rendimiento de manera objetiva, es decir, a través de algún tipo de trabajo experimental
767 en una extensión menor que el requerido en la validación y demostrará que el laboratorio está en
768 capacidad de ejecutar el método de ensayo cumpliendo con los requisitos establecidos en la etapa de
769 validación.

770 Una característica importante en la definición de FDA es el término “examination” en español
771 “examen”, que VIM en la versión 3, también aconseja el uso para referirse a propiedades cualitativas,
772 aquellas que no se expresan en cantidad, por ejemplo, cambios de color. De manera que, una medida
773 de “examen” aplica para referirse a las propiedades nominales que se examinan a través de métodos
774 cualitativos¹¹.

775 Por otro lado, la norma ISO 15189 e ISO Guía 35, usan la expresión tanto para propiedades nominales
776 como para mediciones de cantidades (métodos de medición), de igual manera que es abordado por
777 FDA lo que está muy relacionado con ensayos microbiológicos cuantitativos y cualitativos.

778

779 2.1 ¿VALIDAR O VERIFICAR?

780 2.1.1. Validación

781 De acuerdo con ISO/IEC 17025 (numeral 7.2.2.1)¹⁷ la validación se debe hacer en el caso en que el
782 laboratorio use:

783 ● Métodos no normalizados, como, por ejemplo:

- 784 ○ métodos descritos en publicaciones científicas, empleados a nivel experimental como
- 785 parte de proyectos o actividades de investigación
- 786 ○ métodos desarrollados en otras organizaciones, guías sectoriales con el objetivo de
- 787 ser implementadas por los laboratorios de ese sector.
- 788 ○ métodos reconocidos a nivel nacional, ejemplo: método de recuento de esporas de
- 789 clostridium sulfito reductores de INVIMA (**Libro de métodos INVIMA**)

790 ● Métodos desarrollados por el laboratorio.

791 ● Métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificados de otra forma.

792

793 ○ métodos que están implementados y en ocasiones acreditados dentro de los
794 laboratorios y por solicitud de los clientes se usan con matrices que no están dentro
795 del alcance de la validación, ejemplo:

796 ■ Recuento de *Bacillus cereus* en jugos UHT

797 ■ *Listeria monocytogenes* en agua

798

799 Esta debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de aplicación dadas.
800 También debe validarse cuando es necesario demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos
801 por dos métodos, por ejemplo, un método recientemente desarrollado y un método normalizado
802 existente¹⁸. En resumen, la validación es la verificación de que los requisitos especificados son
803 adecuados para un uso previsto¹¹.

804

805 2.1.2. Verificación

806 El laboratorio debe verificar, es decir, aportar evidencia objetiva que un elemento dado satisface los
807 requisitos especificados¹¹, por tanto, que el laboratorio puede llevar a cabo apropiadamente los

808 métodos antes de utilizarlos, asegurando que se pueda lograr el desempeño requerido (ISO
809 17025:2017. 7.2.1.5). Por otro lado, la ISO 15189 hace hincapié en que “los procedimientos de examen
810 usados sin modificaciones deben estar sujetos a una verificación independiente antes de ser usados
811 como métodos de rutina”, en este sentido, los métodos a verificar son:

- 812 ● Los métodos normalizados
- 813 ● Los métodos alternativos validados

814 Nota 3: La verificación sólo es aplicable a los métodos que han sido validados mediante un estudio entre laboratorios ⁵⁰ sin
815 embargo, como alternativa para métodos que no han sido completamente validados y que no disponen de datos de
816 interlaboratorio propone la “verificación de ítem” (ver anexo F, ISO 16140-3) Ver capítulo 4 de esta guía.

817 Los métodos normalizados, o de referencia, son aquellos publicados por organismos internacionales,
818 ampliamente reconocidos y aceptados; en microbiología incluyen aquellos métodos publicados por
819 ISO, AOAC, NMKL, CEN, DIN, métodos normalizados de entidades regulatorias como USDA, FDA, OIE;
820 así como otros métodos normalizados equivalentes regional o nacionalmente ⁵⁰. También se
821 consideran normalizados aquellos métodos investigados a fondo, los cuales describen las condiciones
822 y procedimientos para la medición de una o más propiedades, son el resultado de ejercicios
823 colaborativos donde se han evaluado las características de desempeño del método por un conjunto
824 de laboratorios competentes para el ensayo; por lo que sirven como referencia para evaluar el
825 desempeño de otros métodos para la misma medición ⁵¹.

826 Por otro lado, dados los requerimientos de muchos de los ensayos normalizados para su
827 implementación en un laboratorio independiente, especialmente en términos de reactivos, muestras,
828 tiempo de implementación y ejecución entre otros, dió lugar al desarrollo de métodos alternativos
829 por parte de organizaciones comerciales, con marcas registradas, denominados “*proprietary method*”
830 por su traducción del inglés ², éstos a menudo resultan más rápidos, más fáciles de usar y susceptibles
831 de automatización, los cuales se distribuyen comercialmente como métodos rápidos o kits
832 diagnósticos, que reducen el tiempo para la obtención del resultado y optimizan la eficiencia del
833 flujo y el manejo de muestras múltiples. Estos son métodos de análisis, comerciales o no, que
834 detectan o cuantifican, en una determinada categoría de matrices, el mismo analito que es detectado
835 y cuantificado por el método de referencia ² y cuyo proceso de validación fue realizado por el
836 fabricante que lo produce, y ha sido reconocido por un tercero, como AFNOR (AFNOR - NF Validation
837 <https://nf-validation.afnor.org/en/nf-validation/>), AOAC - AOAC Research Institute
838 (<https://www.aoac.org/scientific-solutions/research-institute-ptm/>), DIN, ENNAS, CEN MicroVal -
839 <https://microval.org/>, NMKL - NordVal <https://nmkl.org/index.php/nb/nordval>, entre otros) para el
840 analito y alcance de aplicación.

841 La introducción de los métodos alternativos para detección o cuantificación; que son generalmente
842 más baratos de usar, producen resultados más rápido que los métodos de cultivo tradicionales y son
843 más simples de realizar ya que requieren menos habilidades técnicas, hicieron que se tornaran muy
844 populares en la industria de alimentos y en los laboratorios de control y que sean preferidos sobre los
845 métodos de referencia tradicionales para los análisis de rutina. En este sentido, es importante que el
846 laboratorio revise para cada uno de los métodos alternativos en uso el certificado de validación de
847 tercera parte y el método de referencia.

848 El laboratorio entonces puede seleccionar un procedimiento normalizado, publicado como norma o
849 adquirir un sistema de medición comercial, si bien, en estos casos el procedimiento de validación ya
850 ha sido realizado, estos se deben verificar para confirmar la capacidad del laboratorio de ejecutar el
851 método. Esto implica que debe realizarse algún trabajo experimental para demostrar que el método
852 funciona adecuadamente en el laboratorio ⁸.

853 La ISO 16140-3 reconoce que en la actualidad hay algunos métodos de referencia ISO o CEN que no
854 están totalmente validados, por lo cual, como una medida temporal (hasta 2027-12-31), incluye un
855 protocolo específico (anexo F) para su verificación por parte de los laboratorios, mientras se espera
856 que los comités respectivos de ISO y CEN los validen ⁵².

857

858 **2.2 REQUISITOS PREVIOS PARA LA EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS MÉTODOS DE** 859 **ENSAYO MICROBIOLÓGICOS**

860

861 Antes de iniciar la evaluación de desempeño del método es importante que las prácticas de control
862 de calidad estén diseñadas para garantizar que los procesos del laboratorio están bajo control, es
863 decir, disponer de un protocolo de aseguramiento de la validez de los resultados, que corresponde a
864 un requisito normativo de la ISO 17025. Todos los laboratorios tienen algunas prácticas de control de
865 calidad intralaboratorio que han evolucionado a partir del sentido común y de los principios de
866 experimentación controlada, para indicar la eficacia del método y el rendimiento del laboratorio. El
867 sistema de control de calidad de un laboratorio establece las políticas o el programa de control de
868 calidad y las actividades de control de calidad necesarias para minimizar los errores sistemáticos y
869 aleatorios resultantes de las variaciones en el personal, la instrumentación, el equipo, los reactivos,
870 los suministros, los métodos de muestreo y análisis, el manejo de los datos y la presentación de los
871 mismos 20. [Standard Methods, Ed. 23 Cap. 9020]. A continuación se detallan algunos:

872

- 873 ● Personal: Las pruebas microbiológicas deben ser realizadas por un microbiólogo o técnico
874 profesional con un nivel adecuado de educación, formación y experiencia en las técnicas
875 microbiológicas generales que se emplean en el laboratorio, lo que se evidencia en las
876 competencias del personal. Dentro de este contexto, la competencia se define como la
877 aplicación de los conocimientos, habilidades o comportamientos que se utilizan al realizar las
878 tareas de un trabajo específico, de manera que éstas puedan ser definidas, autorizadas y
879 monitoreadas en el tiempo. Si no se dispone de dicho personal, un microbiólogo profesional
880 debe proporcionar formación en técnicas específicas y estar disponible para revisar el trabajo.
- 881 ● Bioseguridad: La bioseguridad es una preocupación para todos los laboratorios
882 microbiológicos para prevenir la exposición al riesgo biológico. Un programa de seguridad en
883 el laboratorio abarca un proceso continuo de reconocimiento, evaluación y mitigación de
884 riesgos asociado a acciones que aseguren que el proceso sea sostenible en el tiempo, lo que
885 se conoce como Gestión de Riesgos en el laboratorio, y tiene como objetivo principal el control
886 de éstos. Hay tres elementos a tener en cuenta: las prácticas de laboratorio, el equipo de
887 seguridad y el diseño de las instalaciones. El personal debe estar capacitado en técnicas
888 asépticas y usar equipo de protección personal (EPP) (gafas de seguridad, ropa de protección,
889 guantes, etc.).
- 890 ● Instalaciones: El laboratorio debe disponer de un diseño de las áreas que faciliten el flujo de
891 las actividades de manera segura, considerar control de acceso, infraestructura y mobiliario
892 que cumpla con los requerimientos de un laboratorio de ensayo microbiológico, disponer de
893 una ventilación libre de polvo y que evite temperaturas extremas o fuera del rango
894 establecido por el área analítica. Los servicios y suministros deben abastecer de manera
895 segura la iluminación, alimentación eléctrica de los equipos, y un abastecimiento adecuado
896 de agua. Desarrollar protocolos de control ambiental para garantizar que las condiciones

897 ambientales no invaliden los resultados, perjudiquen la calidad de las mediciones o dañen al
898 personal. Los controles ambientales incluyen limpieza y desinfección, temperatura y humedad
899 y nivel de contaminación biológica con el monitoreo del control del aire del laboratorio y
900 superficie de los mesones.

- 901 ● Equipos e instrumentos de laboratorio: Identificar el equipo por su número de serie o por su
902 número de referencia único de laboratorio. Verificar, mediante una supervisión constante, un
903 mantenimiento rutinario y preventivo, así como un programa de calibración regular de que
904 cada elemento satisface las necesidades de precisión, minimización de sesgo y trazabilidad.
905 Proporcionar procedimientos escritos sobre el uso, el funcionamiento, la calibración y el
906 mantenimiento de los equipos e instrumentos pertinentes, junto con los criterios de
907 aceptación de control de calidad adecuados. Asegurarse que el laboratorio dispone de todo
908 el equipo, los softwares actualizados y los suministros necesarios para realizar los ensayos.
- 909 ● Suministros de laboratorio: Adquirir y demostrar por medio de registros y los certificados de
910 análisis, trazabilidad, pureza o nivel de tolerancia del fabricante (si se suministran) de todos
911 los suministros de laboratorio.
- 912 ● Procedimientos normalizados de trabajo (PNT): Los PNT genéricos y específicos, constituyen
913 la columna vertebral de un laboratorio analítico y deberían estar diseñados para evitar
914 desviaciones debidas a un proceso o método malinterpretado. Cada PNT específico describe,
915 paso a paso, los detalles de una tarea o procedimiento rutinario adaptado al equipo, la
916 instrumentación y los tipos de muestra propios del laboratorio, vale la pena aclarar que para
917 tener PNT el laboratorio debe haber hecho una selección del método que va a implementar.
918 Asegurarse de utilizar las versiones vigentes con el contenido actualizado. El uso coherente
919 de los PNT ayuda a garantizar la uniformidad de las operaciones. También son una
920 herramienta de formación eficaz y un medio para determinar la competencia cuando se
921 realiza una evaluación.

922

923 Hay al menos cuatro etapas de alistamiento determinantes previo a la evaluación del desempeño del
924 método de medición en microbiología:

925

- 926 ● Selección del método.
- 927 ● Preparación del inóculo.
- 928 ● La selección de las muestras para los ensayos.
- 929 ● Evaluación de los medios de cultivo.

930 A continuación, se describen las características más importantes de cada una de estas etapas.

931

932 2.2.1 SELECCIÓN DEL MÉTODO

933

934 Frente a un requerimiento o necesidad por parte de un cliente, la primera actividad que debe
935 adelantar el laboratorio es la selección del método de medición más apropiado, en este punto las
936 alternativas pueden ser un método cualitativo cuyo objeto es determinar el valor de la propiedad de
937 interes (identidad o detección) o cuantitativo para establecer la cantidad o concentración del
938 microorganismo de interés. En seguida, el laboratorio debe establecer si dispone de métodos

939 normalizados adecuados, no normalizados o si es necesario desarrollar o modificar un método de
940 manera tal que se esté en capacidad de cumplir con los requisitos de uso previsto.

941 Algunos elementos que pueden orientar al laboratorio en la mejor selección del método se basan en
942 identificar si el método ²⁵:

- 943 ○ Se basa en principios científicos subyacentes sólidos.
- 944 ○ Es aplicable para análisis de rutina de muestras.
- 945 ○ Presenta alto nivel de reproducibilidad.
- 946 ○ Puede detectar analitos en el intervalo de concentración de interés.
- 947 ○ Tiene suficiente especificidad y sensibilidad para el uso previsto.
- 948 ○ Puede cumplir con los criterios específicos de rendimiento del método.
- 949 ○ Se puede realizar con equipo fácilmente disponible.
- 950 ○ Se puede realizar a un costo razonable. Efectividad tiempo /costo.
- 951 ○ Aborda el nivel de experiencia requerido (por ejemplo, ¿hay áreas sensibles a la técnica? ¿Se
952 requiere capacitación especializada?).
- 953 ○ Contiene aspectos necesarios de aseguramiento de la calidad (por ejemplo, equipo calibrado,
954 calidad de los medios, condiciones de incubación).
- 955 ○ Aborda los problemas de bioseguridad (por ejemplo, ¿Existen prácticas específicas de
956 bioseguridad necesarias para manejar los patógenos de prueba?)
- 957 ○ ¿El método requiere validación o verificación?

958 Es recomendable tomar el tiempo necesario para seleccionar el método más apropiado según el
959 propósito. Por ejemplo, las detecciones de bajas concentraciones deben estudiarse por razones de
960 salud pública y de otro lado, siempre es deseable escoger el método que mejor recuperación tenga,
961 sin embargo, puede ser mejor escoger uno con baja recuperación pero que no requiera validación
962 confirmación ⁴⁶.

963 Aunque no todas las características de validación son aplicables a todos los tipos de ensayo, las
964 características típicas de validación son:

- 965 ● Especificidad
- 966 ● Linealidad
- 967 ● Exactitud
- 968 ● Precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad)
- 969 ● Rango
- 970 ● Límite de cuantificación
- 971 ● Límite de detección

972

973 2.3 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

974

975 La preparación del inóculo, que generalmente es de manera artificial, es una etapa clave durante la
976 validación y/o verificación de un método, se usa para la adición de las muestras y para el cálculo de
977 algunos parámetros de desempeño (como precisión, límite de detección, sesgo, entre otros). Para esto
978 se pueden usar cepas de colección propia del laboratorio siempre y cuando estén bien caracterizadas,
979 cepas de colección y MR incluidos MR comerciales. En este sentido, es importante garantizar que los
980 microorganismos de interés se encuentren distribuidos de manera homogénea en las muestras de
981 análisis, lo que algunas veces es un desafío en los métodos microbiológicos, por lo que se recomienda

982 el uso de materiales de referencia. Estos adicionalmente permiten establecer de manera rápida,
983 segura y confiable, el valor de la dilución a preparar, para obtener la concentración de
984 microorganismos (en UFC) esperada. De lo contrario, se requiere que el laboratorio estandarice muy
985 bien la preparación del inóculo, bajo las condiciones del ensayo (tipo de microorganismo, matriz, tipo
986 de ensayo) para garantizar dentro de unos límites de confianza adecuados, la dilución a preparar para
987 obtener la concentración deseada.

988 Nota 4: La preparación del inóculo, se realiza mediante diluciones seriadas, las que pueden ser decimales o no, según las
989 indicaciones del protocolo, y en un diluyente apropiado para conseguir el número de organismos deseados (UFC) en un
990 volumen determinado. También es importante indicar que las suspensiones o inóculos se utilizan dentro de un tiempo
991 definido.

992 Si la recuperación del analito es una característica de desempeño a evaluar, los niveles de
993 contaminación de la muestra deberán ser adecuados y ajustados en el laboratorio con los inóculos
994 preparados ²⁵. Es permitido trabajar con muestras artificialmente contaminadas y la concentración
995 adicionada debe estar dentro del intervalo de trabajo seleccionado ⁹. El trabajo con las
996 concentraciones altas del microorganismo no es útil, se prefiere trabajar en concentraciones bajas que
997 además para algunos métodos es lo más deseable. En este punto es importante tener en cuenta la
998 distribución de los microorganismos, que ya no es normal o lognormal, sino que puede seguir una
999 distribución de Poisson, e incluso, debido a la variabilidad natural de los microorganismos que genera
1000 una varianza mayor a la esperada (sobredispersión), una distribución binomial negativa⁵³. En
1001 cualquier caso, la adición debe garantizar homogeneidad en la contaminación de la muestra⁵, las
1002 cuales se inoculan en condiciones asépticas, preferiblemente dentro de una cabina de seguridad
1003 biológica.

1004 La preparación de los inóculos se puede llevar a cabo por medio de los siguientes métodos:

- 1005 ● Turbidimétricos: Se usan principalmente cuando el laboratorio no cuenta con un MR de
1006 concentración conocida. A partir del MR se preparan diluciones seriadas y se puede estimar
1007 la concentración a partir de lecturas por densidad óptica, en especial por absorbancia. Dentro
1008 de estos están:
 - 1009 ○ Patrón de McFarland: Estándar de turbidez para ajustar la densidad de una suspensión
1010 bacteriana. La densidad celular se ajusta en comparación simple con el estándar. Esto
1011 se puede realizar directamente visualmente o midiendo con un espectrofotómetro a
1012 una longitud de onda especificada por el fabricante.
 - 1013 ○ Densímetros: Permiten calcular valores de McFarland de forma automática de la
1014 suspensión del microorganismo.
- 1015 ● Conteo de células viables: Este método permite determinar la concentración de células que
1016 se encuentran vivas. Se realizan diluciones seriadas y una alícuota es sembrada por
1017 esparcimiento en superficie o bien realizar siembra en profundidad sobre una placa de medio
1018 de cultivo sólido. Luego de la incubación, se desarrollarán colonias aisladas a partir de cada
1019 una de las células viables sembradas y se realiza el conteo para estimar la concentración de
1020 acuerdo a la dilución.
- 1021 ● Cálculo o fórmula: A partir de una suspensión inicial conocida de microorganismos, se puede
1022 preparar una concentración deseada empleando la fórmula:

1023
$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

1024 *Ejemplo: Se requiere preparar 50 mL de una suspensión bacteriana con 80 UFC/mL a partir de una suspensión de*
1025 *150 UFC/mL.*

1026
$$V1 = ? \qquad V2 = 50 \text{ mL}$$

1027 $C1 = 150 \text{ UFC/mL}$ $C2 = 80 \text{ mL}$

1028 *Despejando la fórmula sería: $V1 = (V2 * C2) / C1$*

1029 $V1 = (50 \text{ mL} * 80 \text{ UFC/mL}) / 150 \text{ UFC/mL}$

1030 $V1 = 26,67 \text{ mL}$

1031 *Es decir, que se requiere tomar 26,67 mL de la suspensión inicial y completar hasta 50 mL para obtener una concentración de*
 1032 *80 UFC/mL.*

1033 Las diluciones del MR se preparan de acuerdo con el procedimiento de trabajo de cada laboratorio;
 1034 sin embargo algunos documentos de consulta para esta etapa son:

- 1035 ● ISO 16140-2, anexo C: Presenta un protocolo para contaminación artificial de las muestras
- 1036 ● ISO 11133: Preparación, producción, conservación y ensayo de rendimiento de los medios de
- 1037 cultivo, numeral 5.4.2.3³⁰.

1038 La tabla 2 presenta un resumen de los niveles de los inóculos requeridos en ejercicios de validación o
 1039 verificación, de acuerdo con la serie ISO 16140 así como en AOAC, los cuales pueden servir como guía
 1040 en los procedimientos a implementar en los laboratorios.

1041 Tabla 2. Niveles de contaminación para evaluación de desempeño de los métodos microbiológicos de alimentos.

Referencia	Preparación del inóculo	
	Métodos cualitativos	Métodos cuantitativos
ISO 16140-2	<p>Para el estudio de sensibilidad se prepara un inóculo en nivel de recuperación fraccional, (idealmente 50% positivos y 50% negativos). Para cálculo del Límite de detección relativa se deben preparar al menos tres niveles de contaminación. El primer nivel es negativo, el segundo es el nivel de detección teórico y el tercero está justo encima del nivel de detección teórico. El segundo nivel debería tener, al menos, una recuperación fraccional del método de referencia (la recuperación fraccional en el nivel inferior debería ser entre 25% y 75% del número de muestras analizadas).</p> <p>Para inclusividad el nivel del inóculo debe ser de 10 a 100 veces mayor que el nivel de detección mínimo del método alternativo que se está validando y el protocolo del método alternativo debe usarse incluyendo todos (enriquecimientos) los detalles en las instrucciones del método alternativo.</p> <p>Para exclusividad la inoculación de un medio de crecimiento apropiado se realiza con una dilución de un cultivo puro en cada cepa de prueba. El cultivo puro debería crecer en un caldo no selectivo bajo condiciones óptimas de crecimiento para proporcionar poblaciones celulares altas en una etapa estacionaria.</p>	<p>Para el estudio de veracidad relativa y para el estudio perfil de exactitud, las muestras deben estar contaminadas a un nivel que sea representativo de la variación natural del nivel de contaminación.</p> <p>Para el estudio de precisión y el de límite de cuantificación se requiere contar con muestras contaminadas en nivel alto, medio y bajo.</p>
ISO 16140-3	De acuerdo con el diseño experimental seleccionado, se dispone de cuatro niveles: alto (9 veces el límite de detección	El nivel de contaminación debe estar dentro del rango de contaminación natural del alimento. Se presenta un ejemplo de

	esperado), intermedio (3 veces el límite de detección) y bajo (1 vez el límite de detección) y el cuarto nivel, entre 3 y 5 UFC cuando se conoce la concentración inicial del inóculo con el que se va a trabajar (se trabaja con MRC). Ver tabla 4 en ISO 16140-3.	preparación a partir de cepas no cuantificadas y también incluye la opción de usar material de referencia cuantitativo. (ver 6.1.5.2 de ISO 16140-3)
ISO 16140-4	Preparar tres niveles de contaminación, uno cero (blanco), uno bajo (L1) con recuperación fraccional y uno alto con 100% positivos para calcular sensibilidad y límite de detección relativo.	Se requiere contar con muestras contaminadas en nivel alto, medio y bajo para el estudio de precisión y el de límite de cuantificación.
AOAC, apéndice J	Al igual que ISO 16140-4, considera tres niveles de contaminación: un blanco o nivel cero, un nivel fraccional que genere entre un 25% y 75% de positivos, y un tercer nivel con una contaminación que asegure 100 % de positivos.	

1042

1043 2.4 SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS

1044

1045 El material óptimo de ensayo lo constituyen muestras contaminadas naturalmente, sin embargo, en
1046 la práctica no siempre es posible. En algunos casos, es posible tener muestras con microorganismos
1047 acompañantes en bajas o medianas concentraciones las cuales se pueden usar y se recomienda
1048 mantener la carga microbiana natural de la muestra, pero teniendo en cuenta que se pueden
1049 presentar inhibiciones propias de la matriz, ausencia del microorganismo de interés, estrés microbiano
1050 o lesión de los microorganismos, es necesario realizar una contaminación artificial o fortificación con
1051 el microorganismo objetivo ⁵.

1052 La etapa de preparación de las muestras para la ejecución de los estudios es sumamente importante,
1053 la cual varía dependiendo del método y tipo de muestras a analizar. La variedad y el número de
1054 muestras seleccionadas debe ser apropiado; al respecto, el Anexo A de ISO 16140-2 incluye una tabla
1055 de clasificación de muestras de alimentos por tipos, además de sugerir algunos microorganismos que
1056 se puedan considerar para la preparación de las mismas. La selección de los alimentos incluidos en el
1057 estudio debe garantizar aquellos con microbiota propia (natural) alta y baja, diferentes tipos de estrés
1058 debido al procesamiento, así como, elementos crudos (sin procesar) ⁵⁴.

1059 Para el caso de los protocolos de ISO 16140, cada parte detalla cómo se hace la selección de muestras,
1060 y en el caso de AOAC, ésta reconoce las categorías de alimentos y las matrices validadas con éxito en
1061 el estudio del desarrollador del método o en el estudio colaborativo, donde el número de matrices
1062 requeridas depende de la aplicabilidad del método y las cuales deben estar incluidas en el estudio de
1063 validación. En la tabla 3, se recogen algunas indicaciones puntuales de los protocolos de ISO.

1064

1065 Tabla 3. Selección de muestras para adelantar la evaluación de desempeño de los métodos microbiológicos.

Referencia	Selección de muestras	
	Métodos cualitativos	Métodos cuantitativos
ISO 16140-2	Si el alcance va a ser para amplia gama de alimentos, entonces al menos cinco categorías de alimentos deben ser evaluadas. Si el método va a ser para un restringido número de categorías, solo se evalúan esas categorías.	

	Para cada categoría al menos 60 muestras individuales de alimentos deben ser probadas.(Ver 5.1.3.2. de ISO 16140-2)	Para cada categoría mínimo 15 muestras en al menos tres tipos de alimentos por categoría (ver 6.1.2.2. de ISO 16140-2)
ISO 16140-3	Verificación de implementación: Escoger un tipo de alimento (necesario incluir un tipo de alimento que haya sido evaluado durante la validación) que esté dentro del alcance del método validado.	Verificación de implementación: Escoger un tipo de alimento (no necesariamente evaluado dentro del estudio de validación) que esté dentro de la categoría de los alimentos incluidos en el estudio de validación.
	Nota: En los tipos de métodos para la verificación de alimento, si el alcance es “amplia gama de alimentos” se deben incluir al menos 5 categorías o, según el alcance de la aplicación del método en el laboratorio, verificar el número de categorías a incluir en la verificación.	
AOAC, apéndice J	AOAC reconoce las muestras incluidas y validadas exitosamente en el Estudio de validación del desarrollador del método (PTM) o el estudio colaborativo (CS) o el estudio pre-colaborativo (PCS) también denominado validación en un solo laboratorio. Las superficies ambientales se pueden incluir y el director del estudio puede seleccionarlas, todas las superficies declaradas deben estar en el PCS y en PTM. Ver 4.1.3.3. para algunas superficies.	

1066

1067 Otra forma de seleccionar las muestras es teniendo en consideración la información sobre las matrices
1068 o muestras más frecuentemente procesadas en el laboratorio para el microorganismo en cuestión, y
1069 aquellas, que por su naturaleza y composición presentan carga bacteriana para el aislamiento. Así
1070 mismo, se pueden considerar alimentos que hayan sido reportados en brotes de enfermedades
1071 transmitidas por alimentos (ETA) o en retiros del mercado, la información de estos eventos puede ser
1072 consultada en fuentes oficiales del Ministerio de Salud y Protección social (SIVIGILA, Boletines
1073 epidemiológicos del Instituto Nacional de Salud, INVIMA).

1074

1075 2.5 SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1076

1077 Los medios de cultivo, también denominados detectores en microbiología, se encuentran en
1078 presentación líquido, sólidos o semisólidos, son usados para enumeración, detección o identificación.
1079 El control de calidad y de desempeño de los medios es una actividad previa al análisis de las muestras,
1080 bien sea durante la rutina analítica o para la validación/verificación.

1081 Para algunos métodos se usan conjuntos de detectores, como es el caso de NMP en series de 3 o 5
1082 tubos o las placas de microtubos o microplacas en las cuales puede ser un pozo o toda la placa
1083 considerada como el conjunto detector. Todas las formas de validación en microbiología se centran
1084 en el desempeño de los detectores ⁴⁶.

1085 La calidad de los medios depende de la calidad de las materias primas usadas, así como de la
1086 preparación según las instrucciones de los fabricantes y el adecuado almacenamiento y manipulación
1087 de estos ³⁰. La evaluación de calidad de los medios se puede hacer siguiendo los criterios de
1088 desempeño establecidos en la norma ISO 11133: 2014, así como en las farmacopeas donde se pueden
1089 consultar las instrucciones para hacer las pruebas de desempeño de los medios de cultivo (ver capítulo
1090 61) ⁵⁵.

1091 De acuerdo con ISO 11133, las características mínimas de calidad que debe proporcionar un medio de
1092 cultivo son: i) la aceptabilidad de cada lote de medio preparado, ii) la aptitud para el propósito y iii) la
1093 consistencia en los resultados que el medio puede producir; las cuales, en conjunto con los

1094 procedimientos de validación, le permitirán al laboratorio garantizar la calidad de los resultados
1095 proporcionados.

1096

1097 CAPÍTULO 3- VALIDACIÓN

1098

1099 La validación exitosa de cualquier método analítico no es posible sin una planificación y preparación
1100 exhaustivas y sistemáticas. Se debe preparar un plan de validación escrito para cada etapa del proceso
1101 que incluya un diseño experimental y someterlo a una revisión adecuada antes de la implementación.
1102 Por otro lado, se espera que el laboratorio cuente con un sistema o un programa de aseguramiento
1103 de la calidad para garantizar la estandarización y armonización de cada una de las operaciones del
1104 laboratorio ²⁵. Ver numeral 2.2.

1105 Como se ha mencionado previamente, el procedimiento a seguir en relación con las actividades de
1106 validación/verificación de un método, dependerá de la necesidad del cliente, a partir de la cual se
1107 establece el fin previsto del método y, por lo tanto, los requisitos analíticos que éste debe cumplir,
1108 por ejemplo, el tipo de método (cuantitativo o cualitativo), su selección (normalizado, no normalizado
1109 o desarrollados por el laboratorio), así como el contar con personal técnico calificado y entrenado, las
1110 instalaciones y el equipamiento adecuado.

1111 En los casos en los que el laboratorio requiere desarrollar o modificar un método que dé respuesta a
1112 la necesidad del cliente, en cuanto a su capacidad de detección, identificación y/o cuantificación, el
1113 laboratorio debería evaluar una o varias características de desempeño del método, por lo cual es
1114 conveniente validar y demostrar la capacidad de éste para cumplir con el requisito, si el requisito no
1115 se cumple, significa que el método necesita un mayor grado de desarrollo ⁸. En este sentido la
1116 validación debe cubrir ⁵⁶:

- 1117 ● Todo el proceso analítico
- 1118 ● Todo el intervalo de aplicación del método, entendido como el intervalo de concentración de
1119 microorganismos que rutinariamente se somete a medición mediante el método (alto, medio
1120 y bajo)
- 1121 ● Las matrices de interés sobre las cuales se va a aplicar el método.

1122

1123 Así, de acuerdo con el uso previsto definido para el método, lo que se pretende a través del estudio
1124 de validación es demostrar que el método puede detectar, identificar y/o cuantificar un analito o
1125 grupo de analitos ⁶:

- 1126 - En una o más matrices a ser analizadas (ejemplo: derivados lácteos, frutas y productos frescos,
1127 derivados cárnicos, etc.)
- 1128 - En uno o más instrumentos o plataformas de medición (ejemplo: ensayos de detección
1129 tradicionales, plataformas de PCR, microscopía, etc.)
- 1130 - Con una sensibilidad, especificidad, exactitud, precisión, reproducibilidad, veracidad y
1131 robustez demostradas que permita asegurar que los resultados son útiles y apropiados para
1132 tomar una decisión.
- 1133 - Confiable para el uso previsto, como pueden ser: de emergencia o contingencia, screening
1134 rápido, pruebas de alto rendimiento o para análisis confirmatorios.

1135 - Una vez determinadas o verificadas las características de desempeño, estas son útiles para
1136 definir o cuantificar el desempeño del método ⁶.

1137 Aunque hay varias referencias técnicas reconocidas para estudios de validación de métodos, dos de
1138 las más conocidas en microbiología de alimentos son, la guía AOAC Apéndice J: Directrices del Comité
1139 de Métodos de la AOAC INTERNACIONAL para la validación de métodos microbiológicos para
1140 alimentos y superficies alimentarias y ambientales ¹ y los protocolos de la familia ISO 16140 específicos
1141 para la validación de métodos de ensayo microbiológicos de alimentos ^{54, 57, 36} [ISO 16140 partes 5].

1142 Vale la pena aclarar que, los protocolos citados (guía AOAC Apéndice J y la ISO 16140 partes 2 y 6)
1143 definen inicialmente lineamientos dirigidos a los desarrolladores o proveedores de métodos
1144 alternativos de casas comerciales que estén interesados en demostrar la equivalencia y desempeño
1145 de éstos frente a los métodos de referencia. En este sentido, los protocolos de validación establecen
1146 los requisitos en términos de tipo y número de muestras, matrices, niveles de contaminación, número
1147 y tipo de microorganismos, desarrollo de estudios interlaboratorio, etc. Requisitos que no siempre se
1148 ajustan al alcance de aquellos laboratorios que prestan servicios de ensayo a diferentes clientes. Sin
1149 embargo, si un laboratorio desea desarrollar un método propio o adecuarlo para otro alcance
1150 diferente del fin previsto establecido inicialmente, debe validar el método teniendo en cuenta los
1151 lineamientos definidos en la parte 4 de la ISO 16140 la cual está orientada a la validación en un solo
1152 laboratorio, o la validación en un solo laboratorio (SLV) de la Guía AOAC apéndice J.

1153

1154 A continuación, se van a describir brevemente las alternativas para la validación de los métodos
1155 microbiológicos, con dos de las referencias más tradicionales en microbiología de alimentos.

1156

1157 **Guía AOAC Apéndice J**

1158 La guía para validación de AOAC (apéndice J), aplica para cualquier método **(diseñado por un**
1159 **proveedor o casa comercial o no)** que va a ser sometido a evaluación por AOAC con el objeto de que
1160 sea publicado como un método de análisis oficial o certificado como un método **alternativo** bajo el
1161 programa de evaluación del desempeño de métodos (PTM Program) ¹.

1162 Los requisitos de AOAC, también han sido armonizado por la agencia de alimentos y medicamentos
1163 de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés), que dispone de una guía particular para la
1164 validación de métodos analíticos usados en la detección de patógenos microbiológicos en alimentos y
1165 piensos ⁶, cuyo alcance aplica para los laboratorios de la FDA que desarrollan y validan métodos con
1166 fines regulatorios (un alcance diferente al de AOAC).

1167 En la AOAC se definen tres diferentes niveles de validación de acuerdo con el alcance:
1168

1169 - *Validación en un solo laboratorio (SLV por sus siglas en inglés o estudio pre colaborativo):* Se
1170 realiza en el laboratorio donde se origina el método, su objetivo es evaluar algunos
1171 parámetros de desempeño incluyendo inclusividad, exclusividad y probabilidad de detección,
1172 esta etapa permite definir la aplicabilidad del método y constituye la fase previa a un estudio
1173 colaborativo, en el camino hacia el reconocimiento como un método de análisis oficial para
1174 AOAC o como el primer paso en el proceso de validación para un método para aplicaciones
1175 regulatorias de rutina para FDA.
1176

- 1177 - *Validación en un laboratorio independiente (ILV por sus siglas en inglés):* el propósito de esta
1178 validación es evaluar o corroborar si el método puede ser ejecutado exitosamente en un
1179 laboratorio diferente al laboratorio de origen del método. Para AOAC, permite verificar en
1180 particular la probabilidad de detección del método por un tercero y constituye un requisito
1181 para la aprobación como un método de análisis oficial o para la certificación como un método
1182 alternativo; mientras que FDA especifica que puede ser usado para la modificación o
1183 extensión de un método que no requiere una validación intra-laboratorio, específicamente en
1184 los siguientes casos:
- 1185 ○ Métodos nuevos o modificados que no han sido completamente validados a través de
1186 un estudio interlaboratorio.
 - 1187 ○ Métodos validados completamente a través de un estudio interlaboratorio en donde
1188 se ha hecho algún cambio en la preparación de la muestra para una o varias matrices.
1189
- 1190
- 1191 - *Estudio colaborativo o Validación multi-laboratorio (CS o MLV por sus siglas en inglés):* Es un
1192 estudio interlaboratorio donde múltiples laboratorios usan un método de análisis definido
1193 para analizar porciones idénticas de un material homogéneo con el objeto de evaluar
1194 características de desempeño del método, la más común, la reproducibilidad. Para AOAC
1195 constituye un requisito para los métodos de análisis oficial; para FDA este estudio incluye
1196 criterios de inclusividad/ exclusividad, niveles de contaminación del analito, cepas
1197 competidoras y comparación del método con un método reconocido de referencia, si este
1198 existe.

1199 Dado el alcance sobre la aplicación de los métodos validados, en relación con las actividades de
1200 vigilancia y regulación, FDA hace una aclaración sobre el fin previsto que se puede dar a los métodos
1201 según el tipo de estudio de validación al que es sometido el método de análisis ⁶:

1202 *“La validación en un solo laboratorio y la validación por un laboratorio independiente, aplican*
1203 *solo para situaciones de emergencia, mientras que la validación multi-laboratorio (estudios*
1204 *interlaboratorio) se acepta para todos los fines regulatorios. Por ejemplo: análisis de*
1205 *confirmación, estudios de brotes, análisis de rutina para vigilancia y control”.*
1206

1207 **Serie Normas ISO 16140**

1208 ISO cuenta con la serie de normas 16140 para microbiología de alimentos, la cual contiene un conjunto
1209 de protocolos técnicos para la validación de métodos, tanto cualitativos como cuantitativos, entre los
1210 que se incluye la comparación con métodos de referencia, estudios interlaboratorios y recientemente
1211 directrices para la verificación y validación de métodos en un solo laboratorio. Incluye además
1212 recomendaciones específicas para el diseño de los estudios, cálculos y análisis de datos; la serie está
1213 constituida por 6 partes:

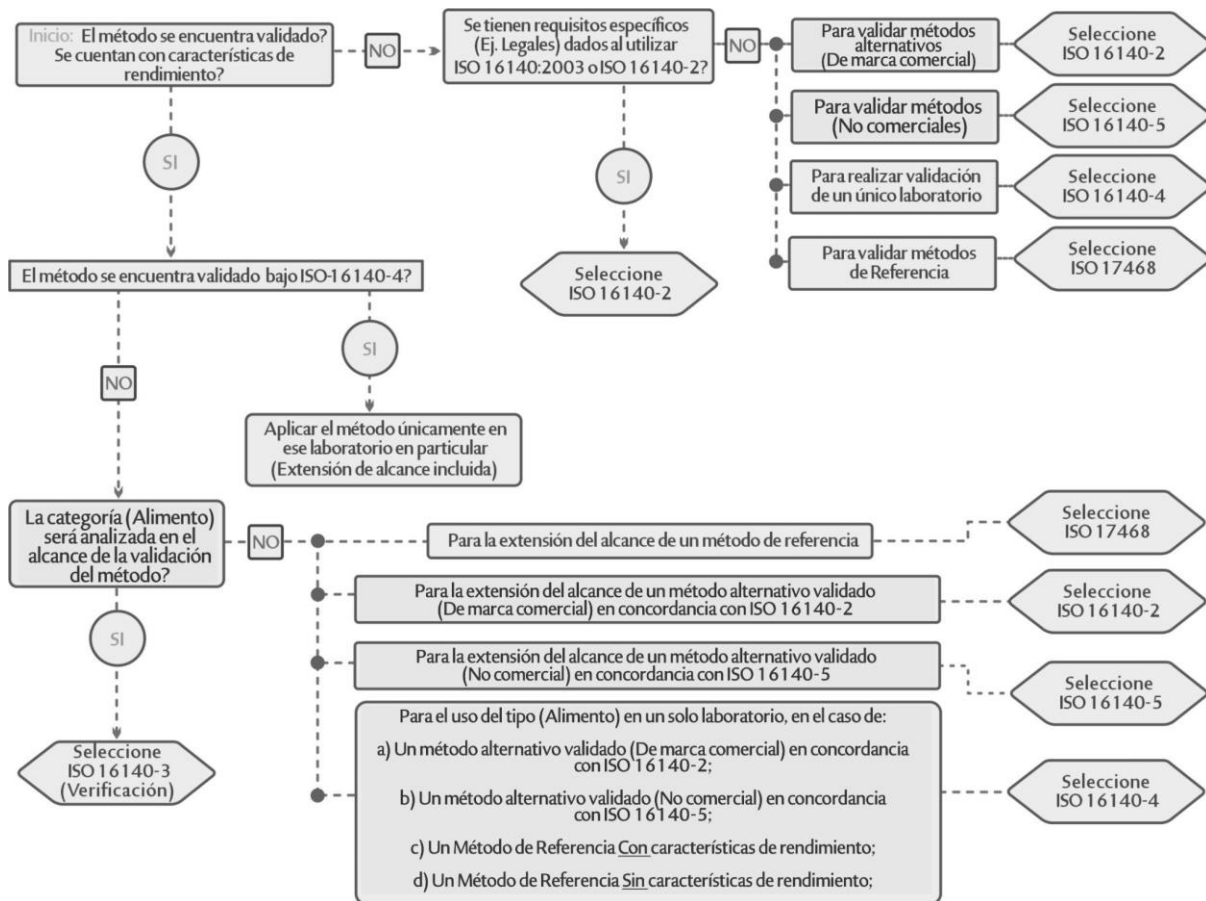
- 1214 ○ Parte 1 (2016): Vocabulario
- 1215 ○ Parte 2 (2016): Protocolo para la validación de un método alternativo (de marca comercial)
1216 frente a uno de referencia
- 1217 ○ Parte 3: (2021) Protocolo para la verificación de un método de referencia y un método
1218 alternativo validado en un solo laboratorio.
- 1219 ○ Parte 4 (2020): Protocolo para la validación de un método en un solo laboratorio
- 1220 ○ Parte 5 (2020): Protocolo para la validación factorial inter-laboratorio de métodos alternativos
1221 que no son de marca comercial (denominados en inglés “non-proprietary”)

- 1222 ○ Parte 6 (2019): Protocolo para la validación de un método alternativo (de marca comercial)
 1223 para la confirmación microbiológica y los procedimientos de tipificación

1224 Con el desarrollo de las nuevas versiones de la serie 16140, la organización tuvo en cuenta que no
 1225 todos los métodos ISO para análisis microbiológico están completamente validados, así como la
 1226 necesidad que puede tener un solo laboratorio para validar un método (*in-house*) y no se tiene acceso
 1227 a un estudio interlaboratorio. La figura 1. es un diagrama que orienta el uso de la serie de normas
 1228 16140 donde especifica en qué parte se debe consultar según el propósito del estudio que se va a
 1229 adelantar, además presenta la relación existente entre las diferentes partes de la norma :

1230

1231 Figura 1. ISO 16140. Diagrama para la selección del protocolo de evaluación del desempeño a realizar.



1232

1233 Traducción de figura de ISO 16140 por INM, 2022

1234

1235 Para un laboratorio de ensayo, una vez definida la necesidad del cliente y establecidos los requisitos
 1236 del método, es el momento de identificar los métodos disponibles y en primera instancia, seleccionar
 1237 el o los métodos normalizados de referencia (de acuerdo con ISO 17468) para implementar en sus
 1238 instalaciones.

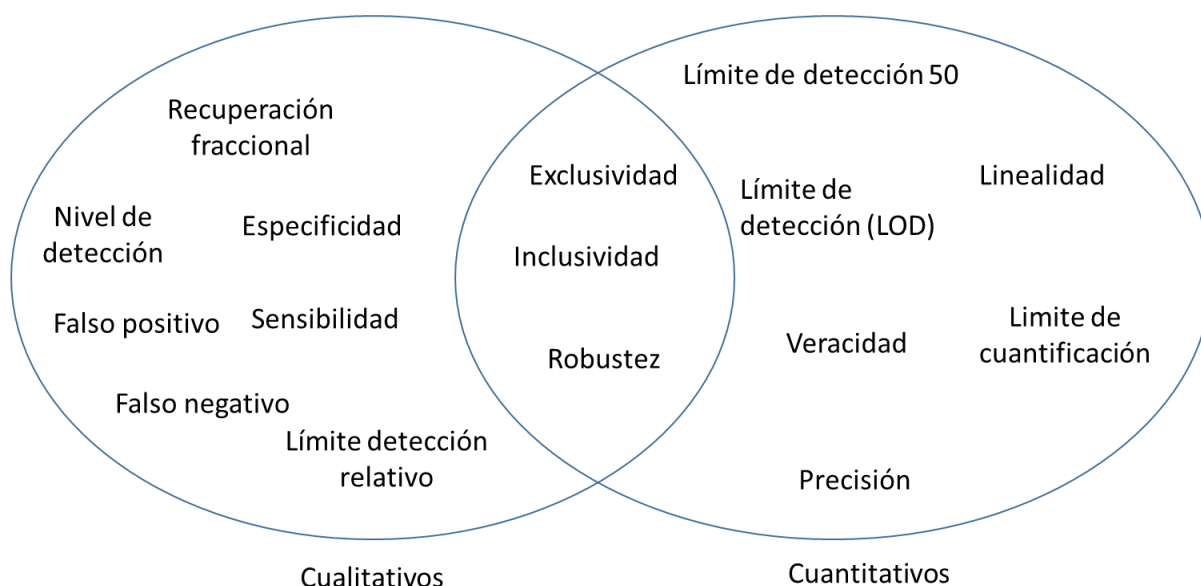
1239 Antes de usarlos en el laboratorio, es necesario demostrar que se puede alcanzar el desempeño
 1240 requerido ¹⁷, por lo cual, los métodos deben ser previamente verificados (ISO 16140-3) o validados
 1241 (Ver figura 1). En el escenario de la validación, el laboratorio puede orientar sus esfuerzos hacia la
 1242 validación en un solo laboratorio (ISO 16140-4), debido a que las otras partes de la norma para este

1243 tipo de estudio son exigentes en cuanto al número de muestras y recursos necesarios, además, van
 1244 más dirigidas a organizaciones dedicadas a desarrollar métodos alternativos con fines comerciales.

1245 **3.1 PARÁMETROS O CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO PARA VALIDACIÓN**

1246
 1247
 1248 Los parámetros de desempeño a evaluar en una validación, corresponden a características
 1249 cuantificables del método, que indican su nivel de calidad y cumplimiento respecto de los requisitos
 1250 analíticos establecidos, y a partir de los cuales, se establecen los criterios de desempeño frente a los
 1251 que se declarará el método como adecuado o no para el propósito (detección, cuantificación o
 1252 identificación) en relación con un método de referencia. La figura 2 resume algunos de los parámetros
 1253 de desempeño más importantes en relación con el tipo de método, y la tabla 3 presenta su definición.
 1254

1255 Figura 2. Relación de los parámetros de desempeño para los métodos microbiológicos.
 1256



1257
 1258 Fuente propia INM, 2021.

1259
 1260 Tabla 3. Parámetros de desempeño para validación de un método de ensayo microbiológico.
 1261

Parámetro	Definición
Exclusividad	Estudio que involucra cepas puras no objetivo, que pueden tener una reacción cruzada potencial, pero no se espera que sean detectadas o enumeradas por el método alternativo ² . Al menos 30 cultivos puros de microorganismos no blanco deben ser probados ⁵⁴ .
Inclusividad	Estudio que involucra cepas diana puras para ser detectadas o enumeradas por el método alternativo ² . Al menos 50 cultivos puros del microorganismo blanco (100 cultivos para el caso de métodos de <i>Salmonella</i>) deben ser probados ⁵⁴ .
Límite de detección (LOD)	Mínima cantidad de organismos cultivables que pueden ser detectados de manera confiable en la muestras mediante un procedimiento de medición definido, con una probabilidad de detección determinada, ejemplo: Para el caso de métodos cualitativos, se define como el menor número de organismos cultivables que son detectados el 50% de las ocasiones por el método de referencia y el método alternativo ⁵⁴ . En microbiología la determinación se basa en replicados de análisis con tres niveles de inoculación del analito blanco. Aplica para métodos cualitativos en microbiología ² .

Nivel de detección	(Métodos cualitativos) Mínima concentración de organismos que produce evidencia de crecimiento en un medio líquido con una probabilidad P=0.95 cuando es inoculado en un medio de cultivo definido e incubado bajo condiciones determinadas ² .
Límite de detección relativo (RLOD)	Relación entre el límite de detección del método de referencia y el método alternativo ⁵⁴
Límite de detección 50 (LOD50)	Concentración del analito con una probabilidad de detección (POD) del 50% ¹ El término "nivel de detección" se utiliza para métodos cualitativos en microbiología basados en análisis repetidos con tres niveles de inoculación diferentes del analito objetivo en una matriz analizada. Se analizan las réplicas y se registra el número de resultados positivos (por ejemplo, 20 %, 70 % y 100 %) respectivamente en cada nivel de inoculación. Luego, estos datos se utilizan para determinar el número de células que darían un 50 % positivo utilizando un modelo lineal generalizado (ver ISO 16140-2) ² .
Límite de cuantificación (LOQ)	Límite de determinación: Menor concentración de analito que puede ser cuantificado con un nivel adecuado de precisión y veracidad bajo las condiciones del ensayo. ²
Linealidad	Métodos cuantitativos: Evaluado en una matriz particular, corresponde a la habilidad del método de producir resultados proporcionales a la concentración de analito presente en la muestra. Un incremento en la cantidad de analito, corresponde a un incremento proporcional en el resultado ¹² .
Precisión	grado de acuerdo entre resultados independientes bajo determinadas condiciones ¹ .
Probabilidad de detección (POD)	Método cualitativo: Proporción de resultados positivos para una matriz determinada, para un determinado nivel o concentración del analito. CITA
Robustez	Sensibilidad del método a pequeños cambios en las condiciones ambientales o factores metodológicos durante la ejecución (tiempo, temperatura de incubación, origen de los ingredientes, pureza, entre otros) ¹² .
Veracidad (sesgo)	Grado de concordancia entre el valor verdadero o valor de referencia aceptado y el promedio de un conjunto de resultados obtenido cuando el método de ensayo es aplicado un número amplio de veces. Se puede obtener a partir de materiales de referencia certificados o en su ausencia materiales de referencia fortificados. ¹²
Veracidad relativa	Razón entre los resultados verdaderos (positivos + negativos) sobre el total de resultados ²
Falso positivo (FP)	Cuando el método alternativo da un resultado positivo sin confirmación y el método de referencia da un resultado negativo. El resultado verdadero es negativo ⁹ .
Falso negativo (FN)	Cuando el método alternativo da un resultado negativo sin confirmación y el método de referencia da un resultado positivo. El resultado verdadero es positivo ⁹ .
Recuperación fraccional	Muestras replicadas del método alternativo o de referencia que producen 50% (rango 25% - 75%) de respuestas positivas ²
Sensibilidad	Proporción de organismos objetivo/diana que el método puede detectar en una población conocida. $S = \text{Verdaderos positivos (VP)} / \text{VP} + \text{FN}$ ¹²
Especificidad	Capacidad del método de establecer los verdaderos negativos, se calcula como la razón entre los verdaderos negativos y la suma de los verdaderos negativos y las muestras clasificadas como falsos positivos $E = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP})$ ¹² .

1263

1264 3.1.1 PROTOCOLO PARA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO EN UN SOLO LABORATORIO

1265

1266 La validación en un solo laboratorio constituye la primera etapa en el esquema de validación de un
1267 método de ensayo, previo al desarrollo de un estudio interlaboratorio, cuando así procede. Por tanto,
1268 la validación en un solo laboratorio o *in-house* solo permite evaluar el desempeño del método en ese
1269 laboratorio particular, en este sentido, los resultados de medición sólo serán válidos en ese
1270 laboratorio.

1271 Uno de los elementos novedosos en la familia de las normas ISO 16140, es la publicación de la parte
1272 4, la cual define los lineamientos para la validación de un método de ensayo (tanto cualitativos como
1273 cuantitativos) en un solo laboratorio; es aplicable para la ampliación del alcance de un método
1274 validado con ISO 16140-2, o modificaciones de los métodos existentes. El procedimiento depende de
1275 si dicha validación se hace frente a un método de referencia o no.

1276 En cada caso, ISO contempla dos aproximaciones para la ejecución de la validación del método de
1277 ensayo:

- 1278 - Una aproximación factorial, que permite la evaluación simultánea de un conjunto de factores
1279 en determinados niveles de manera que refleje las condiciones de variación normal en un
1280 laboratorio, por lo que requiere un menor esfuerzo en términos de la cantidad de muestras y
1281 ensayos a realizar, o
- 1282 - Una aproximación convencional, donde la evaluación de los parámetros de interés se hace
1283 uno a la vez, por lo que requiere contar con un mayor número de muestras y de ensayos.

1284 La tabla 4 resume las diferentes alternativas contempladas en ISO 16140-4 para la validación de
1285 métodos en un solo laboratorio, junto con el número de ensayos requeridos.

1286 Tabla 4. Alternativas para la validación de un método en un solo laboratorio.

Se dispone de método de referencia				No se dispone de método de referencia			
Estudio factorial		Estudio convencional		Estudio factorial		Estudio convencional	
Cuantitativo	Cualitativo	Cuantitativo	Cualitativo	Cuantitativo	Cualitativo	Cuantitativo	Cualitativo
176	236	215	260	128	336	165	460

1287 Fuente, ISO 16140-4

1288

1289 3.1.1.1 ESTUDIO DE VALIDACIÓN EN UN SOLO LABORATORIO

1290

1291 A continuación se presentan los elementos más importantes de la validación en un solo laboratorio
1292 bajo la aproximación factorial y convencional, sin pretender ir al detalle de la implementación, ya que
1293 estos elementos están descritos en la norma.

1294

1295 3.1.1.2 CON APROXIMACIÓN FACTORIAL

1296

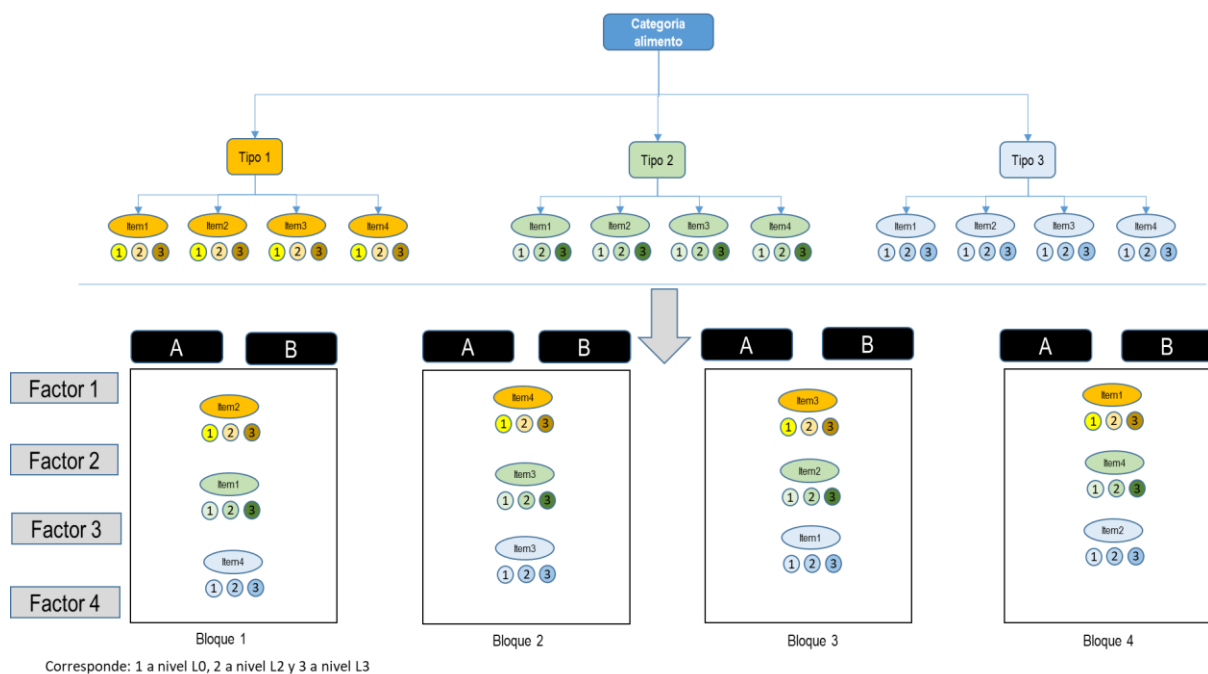
1297 El término diseño factorial o experimento factorial o arreglo factorial, se refiere a la selección de
 1298 diferentes factores o tratamientos de interés que se desean comparar (temperatura, tiempo, etc) en
 1299 dos o más niveles (34°C - 37°C, 30 min - 60 min etc), el objeto en principio es evaluar todas las
 1300 posibilidades (o permutaciones) dadas por la combinación de los diferentes factores y sus niveles, para
 1301 establecer el efecto de cada uno de los factores y eventualmente de la interacción entre factores ⁵⁸.

1302 Si se estudia un factor en forma separada, el resultado puede ser diferente al que resultaría de un
 1303 estudio conjunto, y es más difícil describir el comportamiento general o encontrar la combinación
 1304 óptima de niveles cuando se hace de forma separada ⁵⁸.

1305 Un diseño factorial permite incluir condiciones especiales (factores) que ocurren (pueden variar) en
 1306 los laboratorios rutinariamente: técnicos, medios de cultivo, matrices de alimentos, tiempos,
 1307 temperaturas, entre otros. La selección de los factores debe estar basada en el conocimiento del
 1308 proceso (ver 5.1.1.2.2 de ISO 16140-4) ⁵⁷. Al investigar el método en una variedad de condiciones al
 1309 mismo tiempo, el enfoque factorial permite la generalización de la validación a las condiciones que se
 1310 encuentran comúnmente en el laboratorio y no se limita a una sola condición ⁵⁷.

1311 El documento propone, para la evaluación de una categoría de alimentos (definidas en ISO 16140-2),
 1312 seleccionar 3 tipos, y para cada tipo 4 ítems, cada uno de los cuales se deberá inocular en 3 niveles de
 1313 concentración (L0: blanco, L1: recuperación fraccional 25% - 75% de positivos por el método de
 1314 referencia y L2: nivel alto, 100% de positivos). Disponer los 12 ítems en 4 bloques de manera aleatoria
 1315 garantizando que en cada bloque se cuente con un ítem proveniente de cada uno de los tipos
 1316 seleccionados, cada bloque será evaluado en 2 condiciones diferentes de acuerdo con el diseño
 1317 teniendo en cuenta los niveles de cada uno de los factores estudiados (Figura 3).

1318 Figura 3. Representación diseño factorial para la validación de un ensayo cualitativo frente a un método de
 1319 referencia.



Fuente propia INM, 2022.

1322 En relación con las mediciones:

- 1323 ● Para el nivel L0, seleccionar un ítem de cada tipo de alimento (puede ser un solo bloque), y
 1324 medir por duplicado, para tener un total de 6 ensayos.
- 1325 ● Para el nivel L1, cada uno de los 12 ítems se evalúa por duplicado bajo las dos condiciones
 1326 establecidas por el modelo, para un total de 48 ensayos.

1327 ● Para el nivel L3 se evalúa sólo una réplica en los 12 ítems, bajo las dos condiciones, para un
1328 total de 24 ensayos.

1329 De esta manera, esta metodología sugiere 78 ensayos con el método alternativo a validar y 78 ensayos
1330 por el método de referencia, para un total de 156 ensayos. La evaluación de la inclusividad y la
1331 exclusividad se realiza de manera independiente, por lo tanto, se requiere por lo menos 50 muestras
1332 con diferentes serotipos puros del microorganismo objetivo a evaluar para determinar la inclusividad,
1333 y por lo menos 30 cultivos puros de microorganismos no objetivo, para determinar la exclusividad.
1334 Así, el estudio requiere un total de 236 ensayos.

1335 El análisis y expresión de los resultados se basa en los resultados obtenidos a partir de las tablas de
1336 frecuencia que permiten establecer las tasas de verdaderos y falsos resultados, tanto positivos como
1337 negativos y a partir de estos, determinar características de rendimiento tales como la sensibilidad,
1338 inclusividad, exclusividad, LOD, RLOD, veracidad relativa, entre otras (Figura 4)

1339

1340 Figura 4. Tabla de contingencia para análisis de resultados obtenidos en la validación del método alternativo,
1341 frente a uno de referencia.

		Método de referencia	
		Positivo	Negativo
Método alternativo	Positivo	Verdadero positivo (PA)	Falso positivo (PD)
	Negativo	Falso negativo (ND)	Verdadero negativo (NA)

1342

1343 La evaluación del método de ensayo frente al de referencia se hará por categoría y tipo seleccionados,
1344 con base en el efecto calculado para cada uno de los factores evaluados, de acuerdo con los RLOD
1345 calculados y unos umbrales establecidos para definir los criterios de aceptación.

1346 Sin un método de referencia, la validación del método varía ligeramente, en lugar de un estudio de
1347 comparación basado en el RLOD, todos los cálculos se basan únicamente en los valores LOD50
1348 correspondientes a cada configuración del diseño ortogonal factorial. En este caso, el estudio se
1349 realiza utilizando muestras con niveles de contaminación conocidos y el inóculo debe enumerarse
1350 utilizando un medio no selectivo ⁵⁷.

1351

1352 En la tabla 5, están los parámetros que se determinan y el detalle de como hacer los cálculos se puede
1353 consultar en la parte 2 de ISO 16140 (ver numeral 3.1.1):

1354 Tabla 5. Estudio de validación en un solo laboratorio usando la comparación factorial ortogonal .

Factorial ortogonal Cualitativo			
Con método de referencia	Parámetros	Sin método de referencia	Parámetros

<p>Diseño experimental:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Total de 12 productos por categoría. Tres niveles de contaminación (cero, bajo y alto) y 4 ítems de alimento de cada tipo. - Se distribuyen al azar los cuatro ítems en 4 bloques diferentes y por cada bloque se usa una cepa diferente o la misma cepa en diferentes condiciones de estrés según la relevancia para el alimento. <p>Ver 5.1.1.2.3 ISO 16140-4 Ver Anexo D</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Estudio de sensibilidad - Nivel de detección relativo (RLOD) - Inclusividad/exclusividad 	<p>Diseño experimental:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 16 ítems (tipos de alimentos) de cada categoría de alimentos. - Cada ítem se contamina artificialmente con dos niveles bajo (fraccional) y alto, así como, una muestra blanco para cada ítem. - Cada ítem se analiza bajo 2 condiciones diferentes, es decir, combinando los niveles y los 4 factores <p>Ver 5.1.2.2 de ISO 16140-4 Ver Anexo E</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Estudio de sensibilidad - Cálculo de LOD₅₀ - Inclusividad/exclusividad
Factorial ortogonal Cuantitativo			
Con método de referencia	Parámetros	Sin método de referencia	Parámetros
<p>Diseño experimental:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Total de 12 productos por categoría. (4 productos con baja concentración, 4 media y 4 en alta concentración) - Cada grupo es una combinación de los niveles por los cuatro factores a variar. 	<ul style="list-style-type: none"> - Veracidad relativa y se calcula una total y una separada para cada nivel de cada bloque. - Estudio de precisión: se determina la repetibilidad <i>in-house</i> y la reproducibilidad <i>In-house</i>. - Inclusividad / exclusividad 	<ul style="list-style-type: none"> - Los resultados son comparados con los niveles de contaminación artificial inoculada en la muestra. - Si no se conocen los niveles, se hace evaluación de la proporcionalidad es decir los resultados de diferentes niveles de dilución deben ser inversamente proporcionales a el nivel de dilución. - El protocolo de evaluación de la precisión <i>in-house</i> se hace con pasos de dilución adicionales. - La selección de muestras y métodos es igual al protocolo cuando se cuenta con método de referencia 	<ul style="list-style-type: none"> - Veracidad relativa - Estudio de Precisión - Repetibilidad y reproducibilidad <i>in-house</i> - Inclusividad/ Exclusividad

1355

1356

1357 La parte 4 de 16140 es muy útil para cuando:

1358 - No se requiere una comparación inter-laboratorio

1359 - Cuando se hace el estudio previo del método antes de someterlo a la validación frente a un

1360 método de referencia (si aplica).

- 1361 - Cuando se requiere ampliar el alcance del método ya validado, por ejemplo, la extensión de
 1362 las categorías de alimentos o modificar el tamaño de la porción para analizar
 1363 - Si se necesita hacer modificaciones a un método existente.

1364 El inconveniente es la alta cantidad de ensayos requeridos para proceder con la validación

1365

1366 3.1.1.3 ESTUDIO DE VALIDACIÓN EN UN SOLO LABORATORIO CON APROXIMACIÓN CONVENCIONAL

1367

1368 Esta aproximación está basada totalmente en el protocolo de la parte 2 de ISO 16140. En el caso de
 1369 contar con un método de referencia, la validación consiste en comparar frente a este la sensibilidad y
 1370 el LOD₅₀ (RLOD).

1371 Cuando hay disponible un método de referencia, estimar los parámetros relacionados en la tabla 6,
 1372 cuando no hay método de referencia ver la tabla a continuación:

1373 Tabla 6. Validación en un solo laboratorio de un método alternativo sin método de referencia.

Cualitativos	Especificidad: Nota: Este se debe hacer antes de calcular LOD ₅₀	Cuantitativos	Estudio de veracidad relativa
	Límite de detección LOD ₅₀		Estudio de precisión relativa
	Estudio de inclusividad/exclusividad		Límite de cuantificación: Esto se hace siempre sin método de referencia.
			Estudio de precisión in-house: Se calcula desviación estándar de repetibilidad y reproducibilidad in-house
			Estudio de inclusividad/exclusividad

1374

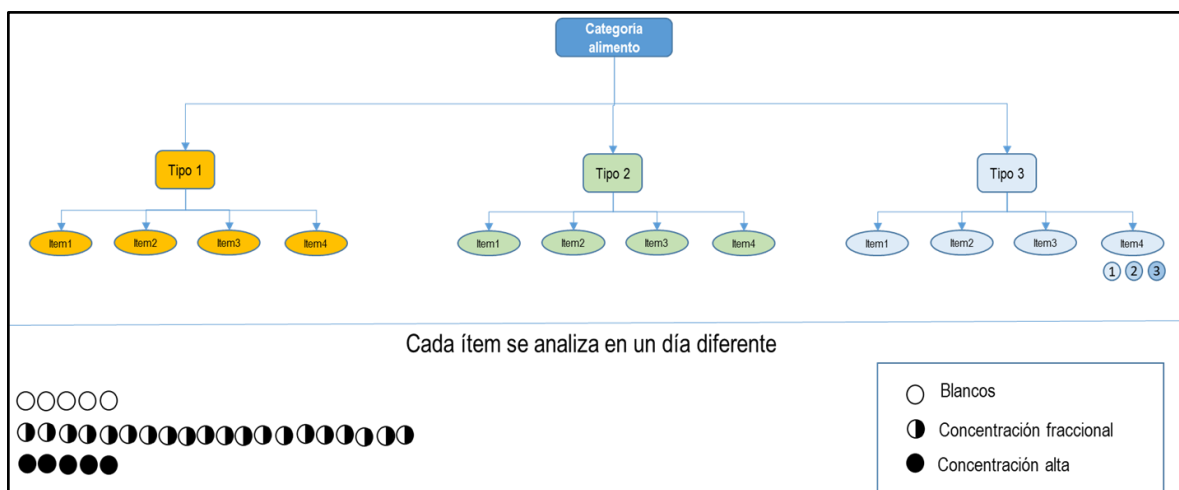
1375 En el caso de una validación de un método de ensayo cualitativo, sin contar con un método de
 1376 referencia, la norma propone evaluar primero la especificidad del método (empleando un conjunto
 1377 de muestras no contaminadas como blancos), y en una etapa posterior el LOD₅₀.

1378 El LOD₅₀ se evalúa siguiendo un esquema similar al del estudio factorial: por cada categoría se
 1379 seleccionan 12 ítems que representan 3 tipos de alimentos, cada ítem se evalúa en días diferentes
 1380 siguiendo un diseño como el de la Figura 5.

1381

1382

1383 Figura 5. Evaluación LOD₅₀ para un método de ensayo cualitativo sin método de referencia.



1384 Fuente propia INM, 2022
1385

1386 Por día se requieren 30 muestras: 5 blancas, 20 muestras en concentración fraccional y 5 muestras en
1387 concentración alta, para un total de 360 ensayos.

1388

1389 CAPÍTULO 4 - VERIFICACIÓN

1390

1391 La verificación es un proceso en el que, mediante evaluación y aportación de evidencia objetiva, un
1392 laboratorio establece si está en capacidad de cumplir con los requisitos particulares de un método de
1393 ensayo (de referencia o alternativo), para poder implementarlo de manera confiable, de acuerdo con
1394 su uso previsto ⁶. Es un estudio de una sola vez, destinado a demostrar que el método funciona en el
1395 laboratorio, siempre que se usa de acuerdo a las especificaciones del desarrollador del mismo ⁵⁹. Tal
1396 como se mencionó en el capítulo 2 de este documento, es importante tener en cuenta el tipo de
1397 ensayo que el laboratorio va a implementar (identificación, detección, enumeración), ver 2.2.1. para
1398 confirmar los requisitos que se deben verificar y el desempeño que se debe alcanzar durante la
1399 verificación.

1400 Los requisitos particulares están asociados tanto con el alcance, así como con las características de
1401 desempeño del método de referencia (o alternativo) (precisión, sesgo, límites de detección, entre
1402 otras), obtenidos a través de su validación, por lo que previo al ejercicio de verificación es importante
1403 conocerlos. Estos normalmente están disponibles con el método de ensayo o a través de su informe
1404 de validación. Sin embargo, algunos métodos de referencia no han publicado los datos de validación
1405 o no han sido validados, por lo que no se dispone de un valor de referencia para hacer la verificación
1406 ⁵⁰. En esta situación, la parte 3 de la serie 16140 publicada en 2021, en el anexo F presenta el
1407 “protocolo para la verificación en un único laboratorio de métodos de referencia no validados”

1408 Como se mencionó anteriormente (ver numeral 2.1.2), ISO propone un tiempo de transición hasta el
1409 31 de diciembre de 2027 para dar tiempo a las organizaciones de validar los métodos que aún no se
1410 encuentran completamente validados ⁵².

1411 A propósito, el comité técnico ISO/TC 34 de Productos alimenticios, división de microbiología (SC 9) y
1412 el comité técnico CEN/TC 463 de Microbiología de la cadena alimentaria, propusieron un tiempo de
1413 transición hasta 31 de diciembre de 2027 con la intención de dar tiempo a las organizaciones de

1414 estandarización, como ISO, de validar los métodos que aún no se encuentran completamente
1415 validados ⁵².

1416 Previo al proceso de verificación, se requiere tener suficiente información del método de referencia,
1417 por ejemplo, es muy importante conocer el alcance y los alimentos con que fue validado; aquellos que
1418 incluyen al menos 5 categorías declaradas son para “amplia gama de alimentos” y aquellos con menos
1419 categorías tienen limitado el alcance a las categorías declaradas. La verificación, por tanto, se centra
1420 en los ítems que se encuentran dentro del alcance de la validación y que se encuentren incluidos en
1421 la aplicación del laboratorio que lo va a usar. De esta forma, el laboratorio puede escoger si quiere
1422 definir el alcance de la verificación para “amplia gama de alimentos” o para las categorías
1423 seleccionadas.

1424 De acuerdo con la norma ISO 16140-3, la verificación de un método de ensayo para alimentos, se
1425 puede adelantar en dos partes: la verificación de implementación y la verificación del tipo (ítem) de
1426 alimento. Sin embargo, la aplicación de una o de las dos partes va a depender de la disponibilidad de
1427 información de los datos de validación del método (de referencia o alternativo) seleccionado. Al
1428 respecto, las opciones son:

- 1429 - Si cuenta con los datos de validación publicados, se hace una verificación del tipo de
1430 alimento y de la implementación.
- 1431 - Si por el contrario, no es un método validado o no se encuentran los datos de
1432 validación publicados, se hace la verificación solo de tipo de alimento (ver anexo F de
1433 ISO 16140-3:2021).

1434 - **Verificación de implementación:** precede a la verificación de tipo de alimento. El propósito
1435 de esta verificación es que el laboratorio pueda demostrar su competencia para ejecutar el
1436 método de referencia seleccionado de manera confiable o eficiente, el proceso varía según el
1437 tipo de método:

- 1438 ○ Cualitativos: El laboratorio **debe** seleccionar un tipo de alimento de los empleados en
1439 la validación, que en lo posible esté dentro del alcance de la aplicación del laboratorio,
1440 empleando además la misma cantidad de muestra tal como lo establece el método
1441 de referencia.

1442
1443 NOTA: la verificación de implementación solo aplica para métodos validados con datos
1444 publicados (ver Tabla 9).

- 1445
1446 ○ Cuantitativos: El laboratorio puede seleccionar un tipo de alimento que esté incluido
1447 en el alcance de la validación , pero que no necesariamente se haya probado en la
1448 validación.

1449
1450 - **Verificación del tipo de alimento:** el propósito de esta implementación es que el laboratorio
1451 pueda demostrar que puede ejecutar el método correctamente con los alimentos que son
1452 evaluados en el laboratorio, por lo que el laboratorio debe:

- 1453 ○ Seleccionar un alimento (que representen un desafío para el laboratorio) de cada una
1454 de las categorías incluidas en el alcance de la validación que también corresponda a
1455 una de las categorías incluidas en el alcance de aplicación del laboratorio, empleando
1456 el mismo tamaño de muestra o menor (si así lo mide en la rutina el laboratorio)

1457 En relación con los parámetros de desempeño a verificar, la familia ISO 16140 define algunos en
 1458 función del tipo de verificación y la disponibilidad o no de un método de referencia con datos de
 1459 validación (Tabla No 7).

1460 Tabla. 7 Parámetros de desempeño para la verificación de métodos microbiológicos según ISO 16140 parte 3.

Tipo de método	Parámetros de desempeño	Tipo de verificación	
	Verificación (parte 3)	Verificación de implementación	Verificación de tipo de alimento
Métodos validados			
Métodos cualitativos	Límite de detección (LOD ₅₀)	si	si
Métodos cuantitativos	Desviación estándar de la reproducibilidad intra-laboratorio	si	no aplica
	Sesgo estimado	no aplica	si
Métodos no validados			
Métodos cualitativos	Límite de detección (LOD ₅₀)	no aplica	si
Métodos cuantitativos	Sesgo estimado	no aplica	si

1461

1462 Respecto a las versiones previas, esta nueva versión establece como parámetro de evaluación el LOD₅₀
 1463 para métodos cualitativos, y la desviación estándar de reproducibilidad dentro del laboratorio y el
 1464 sesgo como parámetros de precisión y veracidad para métodos cuantitativos, simplificando el proceso,
 1465 a la situación cuando solo se disponía de documentos para validación, y donde quedaba a criterio de
 1466 los laboratorios los parámetros de verificación.

1467 En relación con la verificación de los kits o ensayos comerciales (métodos alternativos), como se
 1468 mencionó previamente, la validación se hace por un tercero reconocido (AFNOR, NordVal, Microval,
 1469 AOAC, entre otros) por lo que el informe y datos de validación normalmente están disponibles. En
 1470 este sentido, la FDA, por ejemplo, recomienda que la verificación *in-house* (interna) del método
 1471 alternativo sea para las matrices incluidas en el estudio colaborativo y que se seleccionaron para la
 1472 verificación interna de primer uso del kit. Una extensión de la matriz requiere un estudio de validación
 1473 del método ⁶, así como cambios en las diluciones a trabajar o tiempos de incubación ⁵⁹.

1474 Instrucciones para la verificación de kits de diagnóstico microbiológicos según FDA ⁵⁹:

- 1475 ● Inocular cualquier matriz incluida dentro del alcance del método, con un nivel de inóculo
 1476 cercano al límite de detección. Se sugiere trabajar con la matriz o matrices más frecuentes en
 1477 el laboratorio usuario.
- 1478 ● Hacer 6 replicados de la matriz inoculada y 6 de no inoculada.
- 1479 ● Registrar resultados falsos positivos y falsos negativos observados y verificar el desempeño
 1480 frente a los datos reportados.
- 1481 ● Si no se obtienen falsos positivos o falsos negativos se entiende verificado el método para el
 1482 laboratorio usuario para cualquier matriz declarada en el alcance del kit.

1483 Si no hay datos disponibles del sistema de prueba comercial (kit), el laboratorio usuario es responsable
 1484 de completar la validación del método ¹⁸; razón por la cual, es importante seleccionar un kit adecuado
 1485 a la necesidad, y que haya surtido el proceso de validación por un ente competente.

1486

1487 4.1 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

1488 4.1.1 CUALITATIVOS

1489 4.1.1.1 NIVEL DE DETECCIÓN CINCUENTA ESTIMADO (eLOD₅₀).

1490

1491 El límite de detección cincuenta estimado (eLOD₅₀ por sus siglas en inglés) es uno de los parámetros
1492 más relevantes en cuanto a la verificación de los métodos microbiológicos se refiere (Tabla 9). Dado
1493 que emplea un menor número de muestras con respecto a lo indicado para el LOD en la validación
1494 (ISO 16140-2), por este motivo se denomina “estimado” (ISO 16140-3)⁵⁰. eLOD₅₀ es el único
1495 parámetro que se estima para los métodos cualitativos y se hace tanto en la verificación de
1496 implementación y como en la verificación de tipo de alimento

1497 El objeto de la evaluación de este parámetro, consiste en estimar el nivel de detección, con una
1498 probabilidad de detección del 50%, es decir aquel nivel de concentración del analito, para el cual el
1499 50% de las muestras (réplicas) producirán un resultado positivo (habrá detección); y compararlo con
1500 el LOD₅₀ del método de referencia, de manera que se pueda demostrar que el ensayo realizado en el
1501 laboratorio se desempeña (detecta) dentro de los límites adecuados con respecto al método de
1502 referencia.

1503 La norma propone tres protocolos para determinar el eLOD₅₀ estimado, dependiendo de la habilidad
1504 del laboratorio en la preparación del inóculo y por tanto, en conseguir el nivel deseado de
1505 contaminación o de la disponibilidad de materiales de referencia cuantificados:

- 1506 ● Los dos primeros aplican cuando se usan cepas sin concentración conocida, por lo que el
1507 laboratorio debe establecer la concentración del inóculo:
 - 1508 ○ En el primero, se propone preparar muestras de ensayo contaminadas en 3 niveles de
1509 concentración: 9, 3 y 1 vez el LOD₅₀ del método de referencia, y un blanco, evaluando
1510 1 réplica para el nivel más alto, 4 réplicas para los más bajos y una para el blanco por
1511 defecto es el que el laboratorio debe evaluar primero.
 - 1512 ○ En el segundo, se preparan solo dos niveles de concentración: 3 y 1 vez el LOD₅₀ del
1513 método de referencia, y el blanco, evaluando 3, 4 y 1 réplicas respectivamente. La
1514 norma recomienda emplear éste por si no resulta como se esperaba el desempeño
1515 con el primer protocolo.
- 1516 ● La aplicación del tercer protocolo depende de la disponibilidad de MR cuantificados, ya que
1517 requiere preparar una muestra contaminada entre 3 - 5 UFC / porción de ensayo, en 7 réplicas.
1518 Usando este protocolo, no se calcula el eLOD₅₀, la verificación del LOD₅₀ del método de
1519 referencia se cumple si al menos 6 de las 7 réplicas son positivas, obteniendo conteos menores
1520 o iguales a 5 UFC /porción de ensayo.

1521 Como se expone anteriormente, de manera general, la norma propone evaluar diferentes niveles de
1522 concentración (los niveles son múltiplos del LOD₅₀ del método de referencia) y un blanco, con un
1523 número de réplicas determinado y a partir de los resultados obtenidos; positivos y negativos para cada
1524 uno de los niveles evaluados, se aplica una regresión logística que calcula el valor de concentración
1525 que produciría una fracción de resultados positivos equivalente al 50%, y establece este valor como el
1526 eLOD₅₀. Por facilidad, la norma trae tabulados los valores del eLOD₅₀, de acuerdo a la combinación de
1527 positivos obtenidos para cada nivel evaluado, dato que debe ser multiplicado por el nivel más bajo
1528 inoculado (LIL por sus siglas en inglés) para calcular el valor del eLOD₅₀, facilitando así su cálculo.

1529

1530 El criterio de aceptación definido es que el eLOD₅₀ debe ser menor a 4 veces el LOD₅₀ del método
 1531 validado.

1532
$$eLOD_{50} < 4 * LOD_{50}$$
 EC.1

1533

1534 Cuando la verificación del ítem/ alimento no se puede hacer con un alimento igual al utilizado en la
 1535 validación, es necesario tener en cuenta que el criterio de aceptación se asume como máximo 4 UFC/
 1536 por porción de ensayo.

1537 La evaluación del eLOD₅₀ se hace en UFC/ porción de ensayo, por lo que es importante verificar las
 1538 unidades con las que se reporta el LOD₅₀ del método de referencia (UFC/mL, UFC/g), de manera que
 1539 estas sean transformadas en unidades por porción de ensayo, para poder establecer la comparación
 1540 de la ecuación 1 (EC.1).

1541 *Ejemplo:*

1542 *En la verificación de un método para la detección de Campylobacter spp (ISO 10272-1:2017), se establece como*
 1543 *LOD₅₀ de 2.2 UFC/ 10 g de carne de res picada (Porción de ensayo)*

1544 *Siguiendo el protocolo 1, para la estimación del eLOD₅₀, se prepararon muestras con niveles de contaminación*
 1545 *de 9, 3 y 1 vez el LOD₅₀, obteniendo los resultados descritos en la tabla 10:*

1546 *Tabla 8: Cálculo del LOD₅₀ estimado para el método de Campylobacter spp (ISO 10272-1:2017).*

	Nivel alto 9 * LOD ₅₀	Nivel medio 3 * LOD ₅₀	Nivel bajo (LIL) 1 * LOD ₅₀	Blanco	eLOD ₅₀
Concentración UFC / 10 g muestra	18	6	2	0	
Número de Réplicas	1	4	4	1	
Resultados Positivos	1	4	2	0	0.7 x LIL

1547

1548 *De acuerdo con la norma, para esos resultados, el eLOD₅₀ corresponde al valor de concentración del nivel más*
 1549 *bajo inoculado (LIL = 2 UFC/10 g) multiplicado por 0.7, dando como resultado 1.4 UFC/10 g de muestra.*

1550 *De acuerdo con la ecuación 1, el eLOD₅₀ cumple con el criterio de aceptación establecido, de ser menor a 4 veces*
 1551 *el LOD₅₀ del método de referencia. De esta forma, el laboratorio demuestra que es competente para realizar el*
 1552 *método de referencia para la detección de Campylobacter spp. (ISO 10272-1) en carne de res picada de manera*
 1553 *confiable.*

1554 Como se ha mencionado previamente, la evaluación del eLOD₅₀, requiere la preparación y
 1555 estandarización de inóculos de cepas (cuando no se dispone de MR cuantificados); en matrices y
 1556 niveles de concentración de acuerdo con los métodos de referencia seleccionados. La preparación de
 1557 los inóculos se hace a partir de un cultivo del microorganismo objetivo, confirmando la concentración
 1558 del inóculo por recuento en placa, o por NMP (ver ISO 11133 numeral 5.4). Para el caso de los MR
 1559 cuantificados, se preparan las concentraciones haciendo las diluciones necesarias dependiendo de la
 1560 contracción inicial de la cepa.

1561 La selección de los ítems y la cantidad de éstos va a depender del tipo de verificación que se va a hacer,
 1562 así las cosas:

- 1563 ● en la verificación de implementación, seleccionar al menos 1 ítem de una categoría validada.
- 1564 ● para la verificación de alimento, seleccionar el número de ítems según las categorías a verificar
- 1565 que deben estar dentro del alcance de validación del método escogido por el laboratorio
- 1566 (ejemplo: si el alcance de la verificación es de 3 categorías, se escoge mínimo 1 alimento
- 1567 “difícil o desafiante” por cada categoría) ⁵⁰.
- 1568 ● Escoger y seguir el protocolo escogido para determinar eLOD₅₀.

1569 Las muestras de alimentos se inoculan directamente en la suspensión inicial de cada muestra y se
 1570 escogen cepas de microorganismos, ojalá de las recuperadas de las categorías de alimentos escogidas.
 1571 Paralelo a la inoculación, la norma sugiere sembrar en agar plate count para confirmar la
 1572 concentración del inóculo adicionado, en este punto, las réplicas de cada inóculo deben ser suficientes
 1573 para estimar la concentración válida porque se está trabajando con niveles bajos de concentración de
 1574 microorganismos ⁵⁰.

1575 En el caso que no se dispone de método de referencia, y por lo tanto de un valor de LOD₅₀, la norma
 1576 sugiere emplear como valor de referencia 1 UFC / porción de prueba, aplicando el mismo criterio de
 1577 aceptación de la ecuación 1. Así mismo, hay unos criterios de aceptación para esta categoría de
 1578 métodos definidos que permiten orientar al laboratorio en la evaluación del método verificado ⁵⁰.

1579

1580 Plan de verificación

1581 Es muy deseable contar con un plan de verificación en el laboratorio, que cuente con la aprobación
 1582 del director técnico. Al menos debe incluir ⁵⁹ :

- 1583 ● Tipo de verificación y propósito del estudio
- 1584 ● Propósito del método y descripción del mismo
- 1585 ● Detalles del diseño del experimento:
 - 1586 ○ Número y tipo de muestras
 - 1587 ○ Número de réplicas (incluyendo cuantos días y cuantos analistas)
 - 1588 ○ Características de desempeño que van a ser evaluadas
 - 1589 ○ Criterios de aceptación
- 1590 ● Materiales y equipamiento necesario
- 1591 ● Consideraciones de bioseguridad
- 1592 ● Tiempo estimado para ejecutar el experimento

1593 Algunos parámetros de desempeño evaluados en la verificación se ven influenciados por el tipo de
 1594 cepa, los medios de cultivo de enriquecimiento o las matrices de alimento a evaluar ⁶⁰, por esto es
 1595 especialmente necesario, al planificar los estudios de verificación, obtener toda la información posible
 1596 del método y se debe contar con un profesional capacitado para supervisar el proceso con la
 1597 competencia para definir la ruta de implementación, especialmente cuando no es claro que
 1598 microorganismos usar, que muestras escoger o cómo interpretar los resultados con microorganismos
 1599 difíciles como *Campylobacter* spp. (ejemplo: prueba de identificación, serotipificación)

1600 En última instancia, los laboratorios deben crear un proceso continuo para monitorear y re evaluar el
 1601 ensayo y determinar si la prueba continúa cumpliendo con el propósito deseado. Comprender la
 1602 población de muestras que analiza, por qué se realiza la prueba, así como los costos, el control de la
 1603 calidad y la capacitación que están asociados con la prueba que son igual de importantes para
 1604 garantizar la confiabilidad del laboratorio.

1605

1606 4.1.2 CUANTITATIVOS

1607 De acuerdo con la tabla No 9, en el caso de los métodos cuantitativos los parámetros a evaluar
1608 dependen del tipo de verificación, así como de la disponibilidad de datos de validación del método de
1609 referencia. Son éstos: un parámetro de dispersión; la desviación estándar de reproducibilidad
1610 intralaboratorio y un parámetro de veracidad; el sesgo.

1611 En relación con el parámetro de dispersión (precisión), normalmente el concepto de reproducibilidad
1612 se emplea para referirse al máximo grado de variación al que puede ser sometido un método de
1613 ensayo que puede incluir diferentes sistemas de medición, analistas, días, diferentes laboratorios. En
1614 este caso, se emplea el término “reproducibilidad intralaboratorio” y se refiere al sometimiento del
1615 método de ensayo a diferentes condiciones de variación pero evaluadas dentro del mismo
1616 laboratorio, como son operadores, equipos, reactivos, días; por lo que se podría asimilar al concepto
1617 de precisión intermedia más conocido en los ensayos químicos.

1618 4.1.2.1 DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE REPRODUCIBILIDAD INTRA-LABORATORIO

1619

1620 Aplica para la verificación de la implementación del método, el objetivo es calcular la variabilidad del
1621 método bajo el efecto de diferentes factores de variación en el laboratorio y compararlo con la menor
1622 variabilidad obtenida en el estudio interlaboratorio para la validación del método.

1623 Como su nombre lo indica, se mide a través de la desviación estándar de reproducibilidad dentro del
1624 laboratorio (S_{IR}), es calculada a partir de los recuentos obtenidos por muestras pareadas medidas bajo
1625 diferentes condiciones. El criterio de aceptación está dado en la ecuación 2:

1626
$$s_{IR}(\text{método verificado}) < 2 \times s_{IR}(\text{método validado}) \quad \text{EC.2}$$

1627

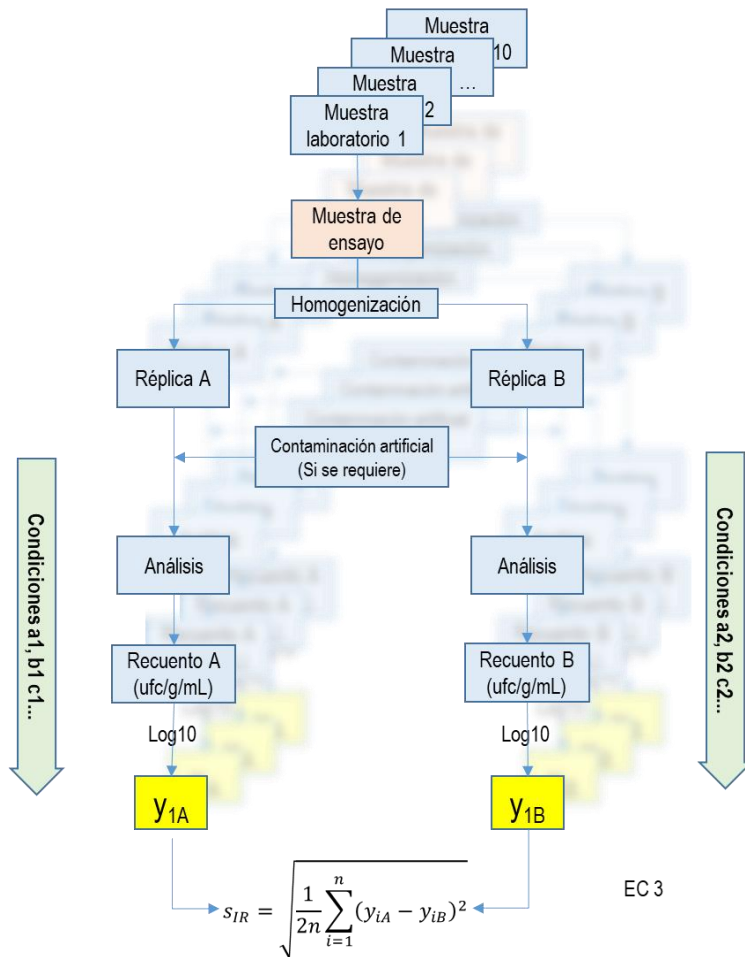
1628 El diseño del estudio incluye como mínimo 10 muestras del mismo ítem (alimento) que esté incluido
1629 en el alcance de la validación del método de referencia, que representen la variabilidad natural de la
1630 población (ejemplo diferentes lotes, diferentes proveedores, etc) y que cubran el intervalo de
1631 concentración de las muestras naturales, para lo cual se pueden fortificar.

1632 Cada muestra debe ser homogeneizada y a partir de esa se divide en dos porciones iguales (Réplicas
1633 A y B), las cuales serán medidas por el método de ensayo a verificar pero bajo diferentes condiciones
1634 (que pueden ser: analistas - a, equipos - b, lotes de reactivos/medios de cultivo - c, entre otras) de
1635 manera que cubran la variabilidad normal que podría tener el método en el laboratorio. Ver figura 5.

1636

1637

1638 Figura 6. Proceso para determinación s_{IR} del un alimento en un laboratorio



1639

1640 donde:

1641 i : índice de las muestras del laboratorio, $i=1$ hasta n ($n \geq 10$)

1642 n : número de muestras

1643 y_{iA} , y_{iB} : \log_{10} de los recuentos de las muestras A y B respectivamente obtenidos por el método de ensayo con las condiciones

1644 a, b y c aplicadas.

1645

1646 La S_{IR} (ecuación 3) se calcula a partir de la raíz de la suma de las diferencias cuadráticas entre los \log_{10}

1647 de los recuentos obtenidos para cada una de las réplicas, esto para cada una de las 10 muestras

1648 (alimentos) seleccionadas. Ver figura 5 , EC 3.

1649 Dado que el criterio de aceptación requiere comparar los valores del laboratorio contra los obtenidos

1650 en la validación del método, este parámetro no aplica para la verificación de métodos cuantitativos

1651 no validados.

1652

1653

1654

1655 4.1.1.2 SESGO ESTIMADO

1656

1657 **Generalidades sesgo en microbiología**

1658 El valor verdadero no se puede probar con el resultado de un método microbiológico, por eso, la mejor
1659 forma de obtener el valor de referencia es por medio de consenso y se puede hacer: comparando los
1660 resultados con otro método de medición, con el promedio del valor de un material de referencia
1661 certificado dado por el productor o con el promedio de las observaciones en diferentes laboratorios
1662 en trabajos de aseguramiento de la calidad ⁹. Sin embargo, las anteriores no son aproximaciones
1663 prácticas. En los laboratorios se puede aproximar al valor verdadero es a través de cultivos de cepas
1664 puros o con muestras esterilizadas adicionadas y usando un método no selectivo para estimar el valor
1665 verdadero (ver numeral 5.4 de ISO 16140-3, o ver numeral 5 de ISO 11133).

1666 Se debe aclarar, que el cálculo de la recuperación absoluta en microbiología no es factible, la mejor
1667 forma de estimar cuantitativamente el sesgo es a través de la recuperación relativa ⁴⁶. En los métodos
1668 de medición microbiológicos cuantitativos, las unidades usadas para informar los resultados son UFC,
1669 estas unidades son en realidad una aproximación al número de partículas real de la muestra lo que se
1670 convierte en una limitación en la capacidad de conocer la verdadera cantidad de analito en la muestra
1671 o porción analizada. La recuperación es relativa.

1672 De otro lado, la recuperación usando MRC con concentraciones conocidas de microorganismos
1673 permite comparar los resultados con un valor asignado como “verdadero”, certificado por el
1674 productor de material. Ver numeral (1.3) para buscar materiales de referencia disponibles.

1675

1676 **Determinación**

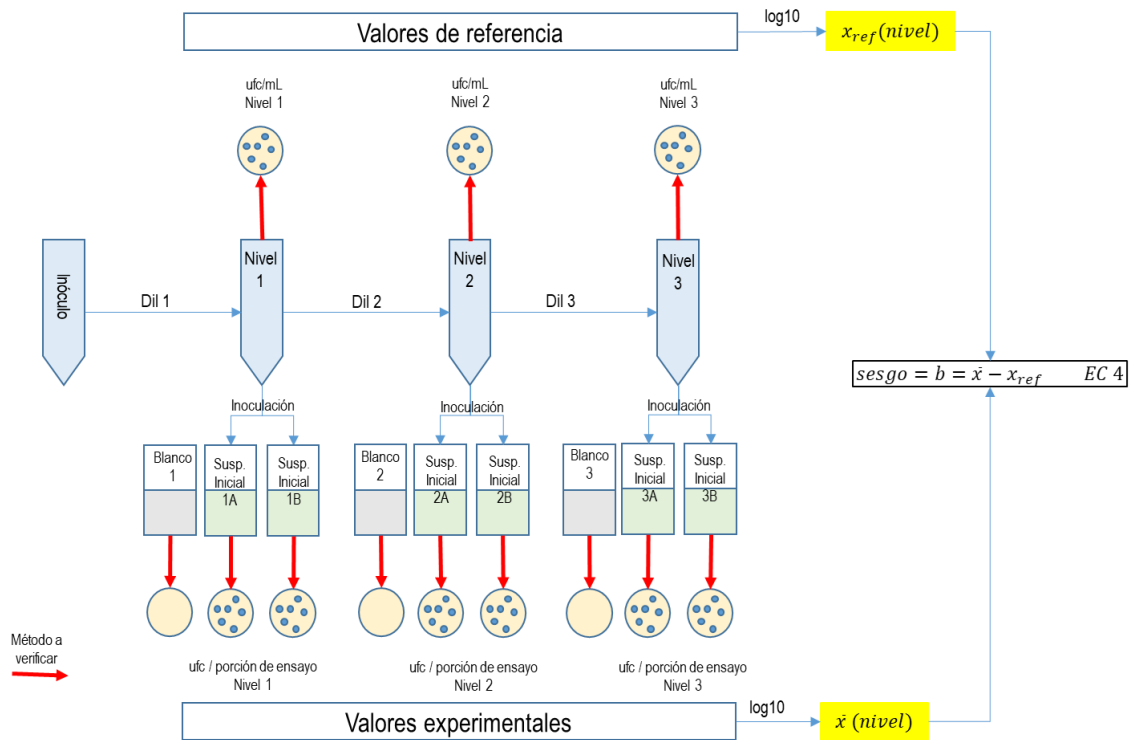
1677 El sesgo estimado aplica para la verificación del tipo de alimento, tanto para métodos validados como
1678 no validados, y evalúa el sesgo, diferencia o proximidad entre los resultados de los recuentos
1679 obtenidos para un conjunto de muestras inoculadas y el inóculo, sin muestra, en tres niveles de
1680 concentración. Como criterio de aceptación de tiene que este debe ser menor o igual a 0.5 log.

1681 De manera general el diseño experimental propuesto en la norma para su evaluación contempla las
1682 siguientes etapas:

- 1683 - Seleccionar al menos una muestra (un ítem) de alimento, preferiblemente la más desafiante
1684 técnicamente de cada una de las categorías de alimentos requeridas, teniendo en cuenta
1685 tanto el alcance del método, así como el alcance de la aplicación del laboratorio.
- 1686 - Contaminar artificialmente por duplicado la muestra de alimento en tres niveles de
1687 concentración representativos de los niveles de contaminación natural de las muestras que
1688 van a ser analizadas en el laboratorio. Se recomienda emplear materiales de referencia, cepas
1689 de colecciones reconocidas.
- 1690 - Hacer el recuento con el método a verificar, tanto de las muestras contaminadas como de las
1691 diluciones del inóculo usado .
- 1692 - Analizar con el método a verificar un blanco o control negativo: una muestra con diluyente
1693 pero sin inóculo, esto con el objeto de determinar el recuento de la microbiota con que viene
1694 la muestra seleccionada.
- 1695 - Se evalúan los resultados expresados como la diferencia absoluta entre la concentración del
1696 inóculo usado y la concentración en la muestra artificialmente contaminada

1697 La figura 7, presenta un esquema del proceso para la evaluación del sesgo:

1698 Figura 7. Proceso para evaluar el sesgo del método en el proceso de verificación de un método



1699

1700

1701 El criterio de aceptación es que el sesgo b , debe ser menor o igual a $0.5 \log_{10}$ (ver figura 7, Ecuación
 1702 4). Se expresa como valor absoluto.

1703 O en términos relativos en porcentaje (Ecuación 5):

1704
$$b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100 \quad \text{EC 6}$$

1705 \bar{x} = media de los resultados

1706 x_{ref} = Valor de referencia adecuado

1707

1708 Para el cálculo del sesgo, se comparan los resultados obtenidos a partir de la concentración del inóculo
 1709 (en \log_{10} UFC /mL) con el de las muestras analizadas (\log_{10} UFC / Porción de ensayo).

1710 La preparación de los inóculos y los cálculos de la concentración de bacterias inoculadas en las
 1711 muestras son actividades relevantes para hacer las estimación de los parámetros. A continuación un
 1712 ejemplo para ilustrar:

- 1713 • *Inóculo de E.coli preparado en el laboratorio:*

1714 1115 UFC/g ($3.05 \log_{10} \text{ UFC/g}$)

- 1715 • *Muestra (item) de alimento contaminado:*

1716 1200 UFC/10g ($3.08 \log_{10} \text{ UFC/10 g}$)

1717 *EL cálculo del Sesgo estimado es :*

1718 $3.05 \log_{10} \text{ UFC/g} - 3.08 \log_{10} \text{ UFC/10 g} = 0.03 \log_{10} \text{ UFC/10 g}$

1719

1720 Finalmente, la verificación de un método puede ser vista como una oportunidad de demostrar que
1721 efectivamente el método funciona de la manera adecuada cuando es ejecutado por el laboratorio que
1722 lo va a implementar, incluso para ítems no evaluados en la validación inicial.

1723 Cuando la verificación del método (cualitativo o cuantitativo) no cumple con los requisitos
1724 establecidos en términos de su sensibilidad; medida como su nivel de detección 50, de su precisión;
1725 medida a través de la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio , o de su veracidad;
1726 medida por su sesgo, se requiere hacer un análisis que permita establecer las causas que pueden
1727 estar ocasionando este comportamiento. Algunas de las que podrían estar asociadas a:

- 1728 ● Personal: entrenamiento y conocimiento del ensayo
- 1729 ● Errores asociados a la estandarización del inóculo, de modo que el laboratorio alcance los
1730 niveles de contaminación lo más cercanos a los definidos en la planeación del ensayo.

1731 Una vez se han identificado las posibles causas del fallo, se sugiere repetir la verificación del método
1732 de referencia y, en lo posible, contrastarlo con un tercer método para definir si el alimento se
1733 comporta de la misma forma en los dos métodos.

1734 Cuando la verificación “no cumple” con los requisitos establecidos, la norma recomienda que el
1735 laboratorio lo reporte al normalizador o al proveedor.

1736

1737

1738

1739

1740

1741

1742

1743

1744

1745

1746

1747

1748

1749

1750

1751

1752

1753

1754

1755

1756

1757

1758

1759

1760

1. AOAC INTERNATIONAL. Appendix J : AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. 1–21 at (2012).
2. ISO. *ISO 16140-1 vocabulario*. www.iso.org (2016).
3. International Organization for Standardization. ISO/IEC 17043 General requirements for proficiency testing. **2010**, (2010).
4. Work, I. *et al.* Ap pen dix D : Guide lines for Col lab o r a tive Study Pro ce dures To Val i date Char ac ter is tics of a Method of Anal y sis. *Main* (2005).
5. SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria & Gobierno de México. GUÍA DE VALIDACIÓN DE METODOS MICROBIOLÓGICOS. 1–14 at (2018).
6. U.S Food and Drug Administration FDA. Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Food and Feeds- Edition 3. 59 at (2019).
7. AOAC INTERNATIONAL. Appendix F : Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 18 at (2016).
8. EURACHEM. *La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas relacionados*. Eurachem vol. Segunda Ed (2016).
9. International Organization for Standardization ISO. ISO 13843:2017 Water quality- Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods. 61 at (2017).
10. Scholer, D. & Officer, C. O. The importance of traceability. **22**, 25.
11. CEM Centro español de metrología. Vocabulario internacional de metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados. Tercera Edición. *Centro Español de Metrología* at <https://doi.org/10.1021/ja01341a021> (2012).
12. Uyttendaele, M. & Debevere, J. *Validation of analytical methods used in food microbiology. Microbiological analysis of red meat, poultry and eggs* (Woodhead Publishing Limited, 2006). doi:10.1533/9781845692513.276.
13. Singh, N. & Anand, S. B. T.-R. M. in F. S. Analytical Methods | Microbiological☆. in *Reference Module in Food Sciences* 1–8 (Elsevier, 2020). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.23005-9>.
14. ONAC Organismo Nacional de Acreditación. Acuerdos de reconocimiento internacional. <https://onac.org.co/acerca-de-onac/acuerdos-de-reconocimiento-internacional/>.
15. Camaró Sala, M. L., Catalá Cuenca, V., Gimeno Cardona, C., Martínez García, R. & Olmos Martínez, P. *Procedimientos De Microbiología Clínica - Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos*. (2013).
16. Gill, A. O. *Chapter 64 - Microbiological Analysis | Standard Methods. Encyclopedia of Meat Sciences* vol. 2 (Elsevier Ltd., 2014).
17. ISO, I. O. for S. ISO/IEC 17025 -General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 34 at (2017).
18. EURACHEM. *Eurachem Guide: Accreditation for Microbiological Laboratories*. (2013).
19. AOAC INTERNATIONAL. TECHNICAL COMMUNICATIONS AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. *J. AOAC Int.* **85**, 1187–1200 (2002).
20. International Organization for Standardization (ISO). ISO 7218:2007/Amd.1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations-Amendment 1. **2013**, 66 (2013).
21. Bari, M. L. & Yeasmin, S. *Microbes Culture Methods. Ref. Modul. Biomed. Sci.* (2021) doi:10.1016/B978-0-12-818731-9.00128-2.
22. U.S Food and Drug Administration FDA. BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-appendix-2-most-probable-number-serial-dilutions> (2020).
23. Tortorello, M. L. *Total Counts: Microscopy. Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* vol. 3 (Elsevier, 2014).
24. Ortega González, M., Rodríguez Martínez, C. & Zhurbenko, R. Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas TT - Validation of alternative methods for the microbiological analysis of food products and water. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* **51**, 111–121 (2013).
25. EPA. Method Validation of U . S . Environmental Protection Agency (EPA) Microbiological Methods of Analysis Prepared for : The EPA Forum on Environmental Measurements (FEM). (2016).
26. Okelo, P. O. Detection and enumeration of microbiological hazards in animal feed. in *Animal Feed Contamination: Effects on Livestock and Food Safety* 56–65 (Elsevier Ltd., 2012). doi:10.1533/9780857093615.1.56.
27. Sandle, T. Rapid and Alternative Microbiological Methods. in *Biocontamination Control for Pharmaceuticals and Healthcare* (ed. Sandle, T.) 141–157 (ACADEMIC PRESS, INC., 2019). doi:10.1016/b978-0-12-814911-9.00009-2.
28. Davey, H. M. Life, death, and in-between: Meanings and methods in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5571–5576 (2011).
29. Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D. & Faucher, S. P. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* **5**, 1–1 (2014).
30. International Organization for Standardization ISO. ISO 11133:2014 Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media. 94 at (2014).
31. Schottroff, F. *et al.* Sublethal injury and Viable but Non-culturable (VBNC) state in microorganisms during preservation of food and biological materials by non-thermal processes. *Front. Microbiol.* **9**, 1–19 (2018).
32. ICMSF.[Ottawa], I. C. on M. S. for F. Microorganismos de los alimentos. (2001).
33. U.S Food and Drug Administration FDA. BAM Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. *2021-11-16* <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>.
34. Salfinger, Y. & Tortorello, M. Lou. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. (American Public Health Association, 2013). doi:doi:10.2105/MBEF.0222.
35. Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica, Nieto, S. & Ramos, S. V. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. (2010).
36. ISO. *ISO 16140-6. Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures*. www.iso.org (2019).
37. ISO, I. O. for S. ISO Guide 33:2015 Reference materials — Good practice in using reference materials. (2015).
38. WFCC World Federation of Culture Collections. WFCC World federation pf culture collections.

1834 https://wfcc.info/about_view.

1835 39. ATCC. Certified Reference Materials - ATCC. *ATCC Tech Bull.* (2019) doi:10.1007/978-3-662-09621-5_15.

1836 40. ILAC. Policy on Metrological Traceability of Measurement Results. *ILAC P1007/2020 ILAC Policy Metrol. Traceability Meas. Results* (2020).

1837

1838 41. JRC European Commission. *CERTIFIED REFERENCE MATERIAL BCR ®-528 CERTIFICATE OF ANALYSIS*.
1839 <http://www.irmm.jrc.be> (1994).

1840 42. ISO, I. O. for S. *ISO/Guide 35:2017(en) Reference materials — Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability.* (2015).

1841

1842 43. ISO. *GUIDE 31 Reference materials-Contents of certificates and labels Second edition 2000.* (2000).

1843 44. ISO. *GUIDE 80 First edition Guidance for the in-house preparation of quality control materials (QCMs) Lignes directrices pour la préparation interne des matériaux de référence utilisés pour le contrôle qualité Reference number ISO GUIDE 80:2014(E) COPYRIGHT PROTECTED DOCUMENT.* (2014).

1844

1845 45. Laso Sánchez, J. Situación de la validación de los ensayos microbiológicos en los laboratorios. 569–575 (2005).

1846 46. ICONTEC. GTC 84 Calidad del agua. Guía para la orientación acerca de la validación de métodos microbiológicos. 1–56 at (2003).

1847

1848 47. WHO, F. A. O. *Statistical Aspects of Microbiological Criteria Related to Foods.*

1849 48. Kumari, B. *Impact of Microbial Distributions. Food Microbiology* vol. 7 (2010).

1850 49. U.S Food and Drug Administration FDA. BAM Chapter 2: Microscopic Examination of Foods. 10/31/2017
1851 <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-2-microscopic-examination-foods>.

1852 50. ISO. ISO16140-3. Protocolo de verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados en un laboratorio. at (2021).

1853

1854 51. Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A. & Uyttendaele, M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology* vol. 27 710–730 at <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.008> (2010).

1855 52. ISO. *Transition period for the implementation of ISO 16140-3.*
1856 [https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method validation-verification/Transition_period_for_the_implementation_of_ISO_16140-3_version_20210119.pdf](https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/Transition_period_for_the_implementation_of_ISO_16140-3_version_20210119.pdf) (2021).

1857

1858 53. Salinas-Rodríguez, A., Manrique-Espinoza, B. & Sosa-Rubí, S. G. *Análisis estadístico para datos de conteo: aplicaciones para el uso de los servicios de salud.* (2009).

1859

1860 54. ISO. ISO 16140-2. *Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.*
1861 www.iso.org (2016).

1862

1863 55. USP, U. S. P. 791> pH, USP 43-NF 38. United States Pharmacopeial Convention. *Inc. Online version 7022* (2020).

1864 56. Camaró-sala, M. L. et al. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. **33**, 31–36 (2015).

1865 57. ISO. *ISO 16140-4 Protocol for method validation in a single laboratory.* www.iso.org (2019).

1866 58. Melo, O. O., López, L. A. & Melo, S. E. Diseño de Experimentos Métodos y Aplicaciones. *Diseño Exp. Métodos y Apl.* (2020) doi:10.36385/fcbog-4-0.

1867

1868 59. ASM, A. S. for M. American Society for Microbiology. <https://asm.org/Articles/2022/January/Planning-a-Method-Verification-Study-in-Clinical-M>.

1869

1870 60. Hazeleger, W. C., Jacobs-Reitsma, W. F. & Den Besten, H. M. W. Level of Detection (LOD50) of *Campylobacter* Is Strongly Dependent on Strain, Enrichment Broth, and Food Matrix. *Front. Microbiol.* **13**, (2022).

1871

1872

1873

1874