

Este Boletín comenzó a editarse en Diciembre de 2017 en formato digital y continuará siendo distribuido en período bimensual a la lista de suscriptos, para mantener la diseminación selectiva de la información escogida por sus suscriptores, a quienes solicitamos actualizar sus datos en "update your preferences" al pie.

[View this email in your browser](#)



BOLETÍN RILAA/ NEWSLETTER INFAL

Grupo Técnico de Microbiología

Octubre 2020 / N° 18

VERIFICACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Anastacio Palacios Marmolejo, Rocío Candelaria Vargas Daniel.
Laboratorio Estatal de Salud Pública de Aguascalientes, México.

Introducción

La verificación de métodos se define como un proceso que demuestra la idoneidad de un método analítico para su propósito de uso (Green, 2006). El propósito de la verificación de un método analítico es garantizar que los resultados obtenidos en los análisis de rutina, están dentro de un valor verdadero o veracidad determinada, para el analito que se está midiendo en una muestra. Los objetivos de la verificación no deben estar solamente basados en determinar el error de exactitud o sesgo de las mediciones, sino que también deberá servir para evaluar los riesgos que pueden estar asociados a la incertidumbre de la medición de un resultado (González & Herrador, 2007).

Para garantizar el cumplimiento del proceso de verificación de un método de prueba debe contener al menos las etapas en la figura 1, cómo un requisito de la norma ISO/IEC 17025 (Eurolab España. Morillas PP, et al.).

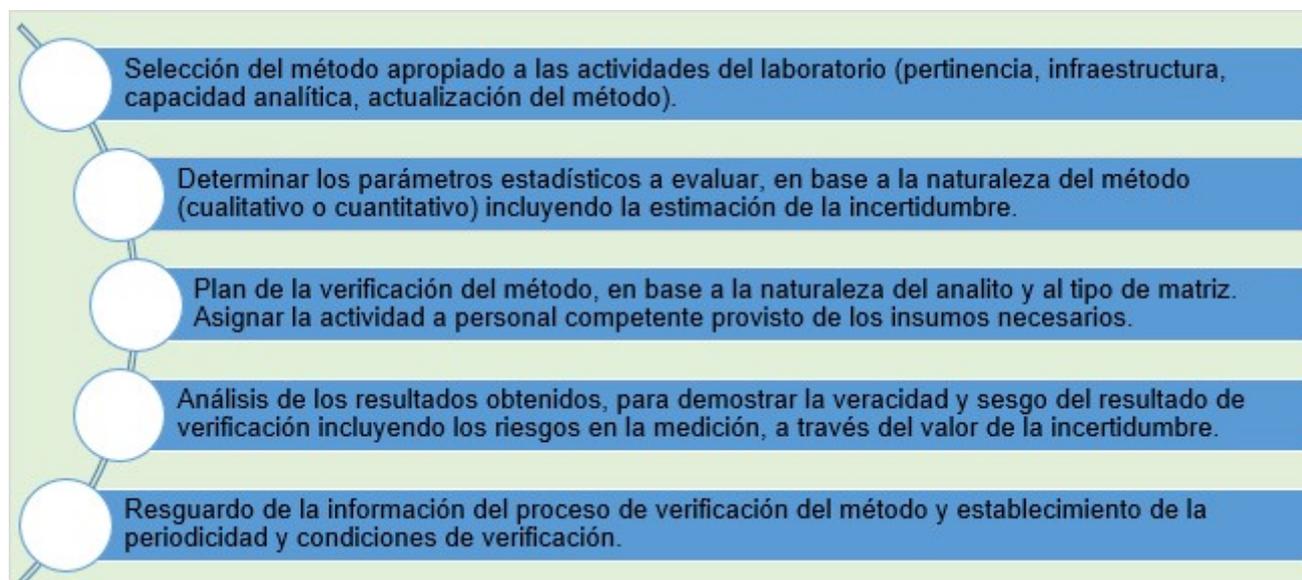


Figura 1. Esquema de trabajo para verificación de métodos de pruebas microbiológicas, en base a los

requisitos de la norma ISO/IEC 17025.

Una vez que se determina la naturaleza del método (cuantitativa o cualitativa) se deben establecer los parámetros estadísticos para el proceso de verificación, que demuestren su veracidad, sesgo y la estimación de su incertidumbre (FEM, 2009; Feldsine et al. 2002).

Desarrollo

Antes de realizar la determinación de los parámetros estadísticos de acuerdo la naturaleza de cada método es necesario realizar la estandarización del inóculo en base a las siguientes etapas:

1. Seleccionar un cultivo puro del microorganismo de interés, puede ser una cepa con trazabilidad ATCC o aislada y caracterizada a partir de un alimento contaminado naturalmente.
2. Determinar la fase de crecimiento logarítmico, para la mayoría de los microorganismos es dentro de las primeras 24h, aunque se debe corroborar en base a la cuantificación en placa. Este es un paso determinante ya que se debe contar con un cultivo fresco para el ensayo, que permita tener la mayoría de los microorganismos viables y cultivables.
3. Una vez que se determina la fase de crecimiento logarítmico se procede a realizar la estandarización del inóculo, tal y como se muestra en la figura 2.



Figura 2. Secuencia de pasos para la estandarización del inóculo.

4. Determinar la dilución de trabajo en base al límite de detección o rango de lectura esperado de la carga bacteriana para cada método de prueba, en la tabla 1, se puede observar la determinación de la dilución de trabajo para un método cualitativo.

Tabla 1. Ejemplo para la determinación de la cuanta bacteriana en base al factor de dilución del inóculo.

		<i>Microorganismo de prueba</i>
Concentración		Cuenta bacteriana en placa ufc/mL
0.5 Mac Farland		150 000 000 (estimado en base a la turbidez)
Factor de dilución	10 ⁻⁶	124, 128, 150, 141, 125, 116 = 784/6 = 130 (cuantificado en placa)
	10 ⁻⁷	12, 12, 16, 8, 10, 14, = 72/6 = 12 (cuantificado en placa)
	10 ⁻⁸	1, 0, 0, 2, 1, 0 (cuantificado en placa)
		Inóculo requerido: Menos de 10 UFC
		Dilución 10⁷ 1 mL ----- 12 X = 0.5 mL tenemos 6 UFC Inóculo para Límite de detección

Además, se deben realizar pruebas preliminares para corroborar el proceso de fortificación de la muestra, lo cual dependerá del método de prueba y de la matriz seleccionada, en la figura 3, se puede observar que es factible recuperar el inóculo añadido, en base a la cantidad de muestra y a la concentración de microorganismos adicionados.

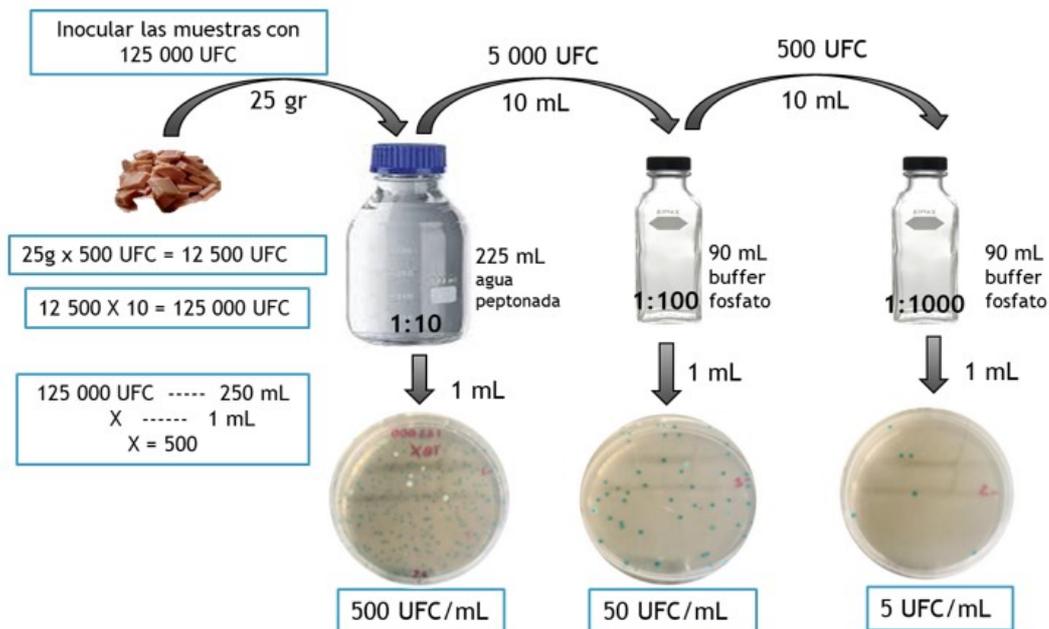


Figura 3. Ejemplo de verificación de la fortificación de la muestra, en donde se puede observar el efecto de la dilución y que la concentración de inóculo fue adecuada.

Una vez que se han determinado los procesos de estandarización del inóculo y de fortificación de la muestra, es factible realizar la determinación de los parámetros de verificación de acuerdo al tipo de método de prueba. Para los métodos microbiológicos cualitativos es factible determinar los parámetros que se establecen en la tabla 2, para demostrar la sensibilidad y especificidad del método.

Tabla 2. Parámetros de verificación para métodos de prueba cualitativos.

Parámetro estadístico	Cómo determinarlo
Verificación del tamaño del inóculo	A partir de una muestra fortificada realizar seis repeticiones. Se debe obtener en promedio menos de 10 ufc (se puede expresar en 25 g o en 10 g) depende del método de prueba.
Verificación de ausencia del analito en la matriz	Corroborar que en al menos tres repeticiones no se obtiene un resultado positivo (0% de positividad)
Límite de detección	Deben participar por lo menos 2 analistas. Se debe tener una muestra fortificada con menos de 10 ufc. Se deben realizar 10 réplicas por analista. Ambos analistas deben obtener una positividad mayor o igual al 80%
Interferentes	Deben participar por lo menos 2 analistas. Se debe tener una muestra fortificada más de 100 ufc de tanto del microorganismo de interés como del interferente. Se deben realizar 10 réplicas por analista. Ambos analistas deben obtener una positividad del 100%

Para el proceso de verificación de métodos microbianos cuantitativos, se pueden determinar los siguientes parámetros estadísticos:

- Verificación de la muestra – Cuantificación del analito en la muestra a analizar;
- Repetibilidad (**r**) – 1 analista implicado, 10 réplicas;
- Reproducibilidad (**R**) – Al menos 2 analistas implicados, 10 réplicas por analista;
- Recobro o % de recuperación – Al menos 1 analista implicado, 10 réplicas;
- Sesgo (Diferencia entre el valor esperado y el valor obtenido, en unidades log) – Al menos 1 analista implicado, 10 réplicas;
- Incertidumbre expandida (**U**).

Conclusión

El proceso de verificación de métodos microbiológicos debe ser una actividad planificada, que debe contar con la infraestructura, el personal calificado y los insumos necesarios. Cada laboratorio debe obtener su propia información sobre la certeza y el sesgo, así como la incertidumbre que son propias de su proceso analítico.

Referencias

Green JM. Peer reviewed: A practical guide to analytical method validation. Anal Chem. 1996; 68(9):305A-309A.

González AG, Herrador MA. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. Trends Analyt Chem. 2007; 26(3):227-38.

Eurolab España. Morillas PP, et al. [Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos](#) – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados [1ª ed. 2016].

The Forum on Environmental Measurements [FEM]. [Microbiology Action Team. Method Validation of U.S.](#) Environmental Protection Agency Microbiological Methods of Analysis. 2016.

Feldsine P, Abeyta C, Andrews WH. AOAC [International methods committee guidelines for validation](#) of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. J AOAC Int. 2002; 85(5):1187-200.



Copyright © OPS/OMS - PANAFTOSA/SPV, All rights reserved.

Usted está incluido en esta lista porque ha aceptado recibir el boletín con las actividades realizadas por la Red Interamericana de Laboratorio de Análisis de Alimentos, así como temas de interés en inocuidad alimentaria involucrados con nuevas técnicas desarrolladas en el laboratorio, validación de métodos de salud pública y actividades del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - PANAFTOSA, de la OPS.

El contenido de este boletín es definido por la Red Interamericana de Laboratorio de Análisis de Alimentos.

Solicitudes, comentarios y sugerencias:

rila@paho.org