

Validación de un ensayo microbiológico

Demaria, M.⁽¹⁾; Ottino, P.⁽¹⁾; Cortes, M.⁽¹⁾; Speranza, J.⁽¹⁾

⁽¹⁾INTI-Lácteos división Rafaela

Introducción

Tanto la metodología vigente requerida por la legislación Argentina como otras de uso frecuente en un laboratorio de alimentos contienen consideraciones muy amplias en algunos casos, contradicciones en otras y también especificaciones muy difíciles de cumplir en la mayoría de los laboratorios de alimentos del mundo (ejemplo: la exigencia de un baño termostático controlado a $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ según APHA ^[1])

Debido a este motivo, se realizó la validación de la metodología del número más probable de coliformes a 45°C , demostrando por medio de estudios de laboratorio que el nuevo método cumple con el propósito para el cual se lo ha diseñado y las características representativas del mismo cumplen con las especificaciones, siendo adecuado para su aplicación analítica en cuestión. ^[2, 3]

El presente trabajo tiene por finalidad el desarrollo de un proceso para la validación de un ensayo microbiológico cuantitativo.

Metodología / Descripción Experimental

Un método normalizado expresa un procedimiento de análisis que incluye los pasos secuenciales (etapas) y técnicas a utilizar en el análisis de muestras específicas y que viene recogido por la normativa de organismos y agencias nacionales e internacionales, competentes en el tema. ^[4] Cualquier diseño de métodos alternativos, requiere una validación comparativa de los resultados obtenidos en el nuevo método con el de otros métodos estándares o normalizados o contra sustancias estándares o patrones.

Mediante un proceso de validación, ya sea de carácter prospectivo, retrospectivo o de revalidación, se comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones prefijadas.

Para asegurar la confiabilidad se determinaron los diferentes parámetros y requisitos a cumplir (prefijados por el laboratorio) considerando que el

ensayo a validar es una determinación microbiológica cuantitativa. Estos fueron los siguientes:

—Especificidad: capacidad de detectar el analito (microorganismo) sin interferencias de otros.

Para realizar el control de especificidad del método se inoculó un recuento conocido de *Escherichia coli* ATCC 25922 en muestras de distintas matrices y se procedió a realizar el ensayo según el procedimiento interno del laboratorio.

Sobre la misma muestra se inoculó cepas de *Staphylococcus aureus subespecie aureus coagulasa positiva* ATCC 25923 de valor conocido y se procedió a realizar nuevamente el ensayo.

—Sensibilidad: relaciona la aleatoriedad de la respuesta con la aleatoriedad de la variación de la concertación de microorganismos.

La sensibilidad se comprobó probando por lo menos dos puntos de la recta de linealidad de la siguiente manera:

A una muestra de diferentes matrices con recuento conocido de coliformes a 45°C se realizó una adición estándar de cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 de modo de comprobar si el método detecta el estándar agregado.

—Repetibilidad: es el grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando realizadas en las mismas condiciones de medición.

Para ello se realizó el recuento de coliformes a 45°C sobre una muestra de diferentes matrices sembrando diez veces la misma muestra por un mismo analista.

—Reproducibilidad: es el grado de concordancia entre los resultados de mediciones del mismo mesurando realizadas en diferentes condiciones de medición.

Para ello se realizó el recuento de coliformes a 45°C sobre una muestra de diferentes matrices sembrando la misma muestra por diferentes analistas.

—Precisión relativa: capacidad del método de dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente en una muestra.

La precisión relativa se comprobó evaluando la concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando un método de referencia para recuento de *Escherichia coli* aprobado por Método oficial de Analisis AOAC para alimentos Método 991.14 .

Se realizó un agregado de cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 en muestras de diferentes matrices y se siembra mediante los dos métodos.

—Límite de cuantificación: es el número mínimo de organismos dentro de una variabilidad definida que pueden determinarse bajo las condiciones experimentales del método evaluado.

Para ello se inocularon las muestras con un valor mínimo de *E. Coli* ATCC 25922 y se procedió al recuento mediante técnica de número más probable y recuento de *E. Coli* por el método de film deshidratado (Petrifilm) aprobado por AOAC, Método 991.14, para comprobar el número mínimo de *E. Coli* que es cuantificado con la técnica de número más probable.

—Incertidumbre: se evaluaron las probables fuentes de incertidumbre que pueden influir en el resultado de NMP de coliformes a 45° C, expresada como incertidumbre estándar relativa: del número más probable, del factor de dilución, del volumen, de la lectura y de la pesada de la muestra.

Resultados

Los resultados obtenidos son presentados en la Tabla I

Tabla I. Evidencias de la validación

| Parámetro | Requisito a cumplir |
|---------------------------|---|
| Especificidad | Se considera que el procedimiento de es específico si los resultados obtenidos en las muestras con la adición de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> se encuentran dentro de los límites de confianza del 95% de los valores de las muestras inoculadas solamente con cepas de <i>Escherichia</i> |
| Sensibilidad | Superior a 0,75 (expresada respecto de 1 unidad de colonias contadas por Petrifilm) |
| Repetibilidad | Inferior a 0,6 (expresada como desviación estándar) |
| Reproducibilidad | Inferior a 0,7 (expresada como desviación estándar) |
| Precisión relativa | Coefficiente de correlación superior a 0,95 (respecto de petrifilm) |
| Límite de | Intervalo con límite inferior 9 |
| Incertidumbre | Cada resultado afectado con la incertidumbre debe permanecer dentro de los límites de confianza de 95% de la tabla de NMP de MAN [5] |

Conclusiones

Se recogieron todas las evidencias necesarias, las que fueron estudiadas, comprobando que los valores de los parámetros coinciden con los requisitos que estos deben cumplir para que el método sea adecuado, concluyendo en una declaración de validez esperada.

Referencias

- [1] Compendium of methods for the microbiological examination of foods. - Compiled por APHA Technical Committee on Microbiological Methods for food - 3º edición 1992 - capítulos 6 y 24.-
- [2] Guía ENAC para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos - G-ENAC-04 Rev. 2-3-97
- [3] Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración - ISO /IEC 17025 edición 1999
- [4] Bacteriological Analytical Manual - U. S. Food & Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition - Enero 2001 Apéndice 2 -Número más probable para serie de diluciones
- [5] J. C. Eur. J. Appl. Biotechnol, Tabla de NMP de Man, 17: 301-305 (1983)

Para mayor información contactarse con:
Demaria Mónica - demaria@inti.gov.ar