

Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. Métodos cualitativos

Validation of alternative methods for microbiological analysis of foods and water. Qualitative methods

Lic. Meylín Ortega González^I; DrC. Claudio Rodríguez Martínez^{II}; DraC. Raisa Zhurbenko^{III}

^ILicenciada en Ciencias Farmacéuticas. Investigadora Agregada. Centro Nacional de Biopreparados (BioCen). Ciudad de La Habana, Cuba.

^{II}Ingeniero Tecnólogo. Doctor en Ciencias Técnicas. Investigador Titular. BioCen. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{III}Ingeniera Tecnóloga. Doctora en Ciencias de los Alimentos. Investigadora Titular. BioCen. Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN

Internacionalmente han aumentado las exigencias para la adopción de nuevos métodos microbiológicos para el análisis de aguas y alimentos. Estos son adoptados cuando ofrecen rapidez, menor laboriosidad, son más sencillos, entre otras ventajas. Para lograr este objetivo, es necesario demostrar su fiabilidad y la equivalencia en relación con los métodos tradicionales existentes. En Cuba esta temática es relativamente incipiente, por lo tanto, resulta oportuno realizar una revisión bibliográfica sobre esta materia. El objetivo de esta primera revisión consiste en abordar los parámetros más significativos relacionados con la validación de métodos microbiológicos cualitativos alternativos.

Palabras clave: validación, métodos cualitativos, métodos alternativos, microbiología, estudios colaborativos.

ABSTRACT

Internationally the demands for the adoption of new microbiological methods for the analysis of waters and foods have increased. These are adopted when they are high-speed, less laborious, more easy, among other advantages. To achieve this objective, it is necessary to demonstrate their reliability and the equivalence according to the existent traditional methods. In Cuba this topic is relatively incipient, therefore it is appropriate to carry out a review on this matter. The objective of this first revision consists on approaching the more significant parameters related with the validation of alternative qualitative microbiological methods.

Key words: Validation, qualitative methods, alternative methods, microbiology, collaborative studies.

INTRODUCCIÓN

Los métodos microbiológicos alternativos surgen como una necesidad para obtener respuestas más rápidas y exactas de la presencia de un microorganismo determinado en la muestra sometida a análisis. Estos se definen como métodos de análisis que demuestran o estiman, para una determinada categoría de producto, el mismo mesurando que si este fuera medido utilizando el método de referencia correspondiente.¹ Se entiende como mesurando, el componente medido por el método de análisis, que puede ser el microorganismo. El método de referencia es un método reconocido internacionalmente y ampliamente aceptado.¹

Las primeras validaciones de métodos reportadas corresponden a las de métodos analíticos químicos, teniendo un especial auge a comienzos de la década de los 90, y han sido ampliamente abordadas por diferentes organismos reguladores.^{2,3} Estas revisten importancia puesto que corresponden, en la mayoría de las ocasiones, a métodos farmacéuticos, un sector muy sensible, por ser vinculación directa a la salud humana.^{4,5} La validación de los métodos es el proceso donde se evalúa si un método analítico es aceptable para un propósito definido. En el caso de los métodos farmacéuticos, *United States Pharmacopeia* (USP),⁶⁻⁸ *Conference on Harmonization* (ICH),⁹ así como *Food and Drug Administration* (FDA),^{10,4} proveen guías para desarrollar estas validaciones.

Posteriormente, con el avance de la ciencia y la técnica, así como la necesidad de contar con métodos más rápidos y confiables, comienzan a surgir otros métodos alternativos para diferentes propósitos, entre ellos los microbiológicos, utilizados ampliamente en el control de la calidad de aguas y alimentos para la detección de microorganismos que refieren su calidad sanitaria. Estos métodos también necesitaron de validaciones que garantizaran su capacidad de proveer resultados similares a los obtenidos por los métodos tradicionales y, por tanto, comenzaron a elaborarse guías por diferentes organizaciones expertas alrededor de todo el mundo para las validaciones de estos métodos, en las cuales se abordan, desde los conceptos aplicados en los documentos, hasta el procesamiento estadístico de los datos obtenidos y su análisis con las conclusiones del estudio.^{1,4,11}

En este trabajo se pretende realizar una recopilación sobre los temas esenciales relacionados con la validación de los métodos alternativos aplicados al análisis microbiológico de aguas y alimentos.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO

Según *NordVal*,¹¹ la validación de un método alternativo es el procedimiento para demostrar si los resultados obtenidos por dicho método son comparables con aquellos obtenidos utilizando los métodos de referencia. Sin embargo, la AOAC Internacional, en el año 2002¹² y la ISO,¹ coinciden en la terminología y definen más completamente el término, añadiendo al concepto la demostración de que una adecuada confianza es proporcionada al comparar los resultados obtenidos por ambos métodos, empleando los criterios estadísticos contenidos en los protocolos de validación aprobados por cada organismo regulador.^{1,11}

En Cuba, el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) contempla, en su regulación 41-2007, un acápite destinado a la validación de métodos alternativos.¹³

La validación de los métodos alternativos comprende un análisis, dependiendo del tipo de método (cualitativo o cuantitativo), y del estudio, teniendo en cuenta la fase, si es intra o interlaboratorial. Los principales órganos reguladores a escala mundial, dedicados a estos temas, entre los que se encuentran: *International Organization for Standardization (ISO)*, *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, *Association Française de Normalisation (AFNOR)*, *European Standardization Committee (CEN)* y *Nordic System for Validation of Alternative Microbiological Methods (NordVal)*, proponen esquemas para la validación de estos métodos alternativos, donde recomiendan diferentes parámetros a determinar, coincidiendo entre sí en muchos de estos, pero con algunas diferencias. Los procedimientos descritos en ISO 16140, AFNOR y NordVal, requieren que el laboratorio experto esté acreditado para realizar estudios en el campo de la aplicación para la cual se hace el estudio, sin embargo, esto no constituye una exigencia para AOAC. Por otra parte, la norma ISO/CD 17994:2001,¹⁵ destinada a establecer la equivalencia entre 2 métodos (alternativo y de referencia) para el análisis de aguas, difiere ampliamente de los otros procedimientos, ya que determina solo la equivalencia de los métodos, en contraste con los otros que conciernen a la validación del método alternativo.^{13,14}

En la actualidad, el método más adoptado para la validación de los métodos alternativos es el propuesto por el estándar ISO 16140:2003 *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods*.¹ Este está destinado a proveer al laboratorio organizador una guía para el análisis de métodos microbiológicos alternativos utilizados en el análisis de alimentos, alimentación animal, muestras veterinarias y ambientales.

Primeras herramientas empleadas para la validación de métodos utilizados en el análisis microbiológico de los alimentos

Según AOAC Internacional,¹⁶ los estudios colaborativos constituyeron la primera herramienta de validación, en los cuales, analistas experimentados y competentes (colaboradores) trabajaron independientemente en laboratorios diferentes, utilizando el nuevo método para analizar muestras homogéneas de prueba para un

analito en particular. En un comienzo se realizaron ensayos de comportamiento ante cambios pequeños que pudieron ocurrir en el entorno y/o en las condiciones de operación, lo cual fue considerado como la demostración de la fortaleza del método. Posterior a estos ensayos, se conduce a un estudio pre-colaborativo, el cual tuvo como objetivo fundamental demostrar la aplicabilidad del procedimiento. Se puede definir, primeramente, en qué categoría de alimentos (matriz) puede ser utilizado, ya sea en alimentos estrechamente relacionados (carne de pollo, pavo y pato), como en una categoría más amplia (alimentos con alto contenido de humedad). Por otra parte, sirve como un ensayo preliminar para detectar y eliminar posibles interferencias en el posterior estudio colaborativo. Estos estudios preliminares son normalmente realizados en solo un laboratorio.

Luego de ser elaborados los protocolos para llevar a cabo el estudio colaborativo por el árbitro asociado y ser aprobados por el árbitro general, consejero estadístico y consejero en seguridad, se procede a realizar el mismo.

Los métodos que generen datos cualitativos requieren de analizar 2 niveles de analito por cada tipo de alimento, así como 5 réplicas para cada uno de estos niveles, 5 controles negativos o sin inocular y al menos 15 laboratorios deben aportar datos válidos.¹⁵

Una segunda herramienta de validación se utiliza para los métodos dobles-verificados, la cual es menos compleja que un estudio colaborativo completo y es aplicable, por ejemplo, a revisiones de métodos validados para extender su aplicabilidad, nuevas técnicas analíticas, adaptaciones de métodos, entre otros. Necesita de un laboratorio responsable del estudio y de otro escogido por él. No tiene un número definido de muestras, pues estas son escogidas en dependencia del propósito del estudio. Esta validación surge por la necesidad del analista que en ocasiones requiere de una validación menos exigente que un estudio colaborativo completo o porque cree que no es práctico esperar uno o dos años por la ruta de este estudio completo. Son revisados al menos por un árbitro técnico con una frecuencia quinquenal.¹⁵

Otra de las 3 herramientas que utiliza AOAC Internacional es para la validación de juegos de prueba, sistemas que contienen elementos determinados para detectar uno o más analitos en una matriz determinada, aunque existen fabricantes que prefieren someter estos juegos a un estudio colaborativo completo para poder hacer de su procedimiento un método oficial. Es realizado por un laboratorio responsable del estudio y por otro asignado y contratado por el Instituto de Investigaciones AOAC Internacional, el cual, además, le asigna 2 revisadores expertos. Deben ser revisados anualmente.¹⁶

Matrices a utilizar en la validación de métodos alternativos. Contaminación natural y/o artificial

En los estudios colaborativos, los alimentos (matrices) son comúnmente inoculados con el microorganismo de interés, ya que los productos naturalmente contaminados no son disponibles frecuentemente.^{11,16,17} El laboratorio organizador es el encargado de hacer llegar a los laboratorios colaboradores, en condiciones adecuadas las matrices previamente inoculadas. AOAC Internacional, incluso, recomienda que en caso de matrices que puedan ser afectadas por descomposición, se pueden enviar, paralelo a las muestras, suspensiones con el analito de interés para que el propio laboratorio inocule artificialmente y analice las mismas.

Esto constituye un elemento crítico, pues la homogeneidad de las muestras es clave para obtener resultados confiables de la validación y esta debe ser realizada por el laboratorio organizador, además, por un personal especialmente entrenado para el desarrollo de esta actividad.¹

Por otra parte, la validación de un método alternativo, según ISO,¹ estándar mayormente adoptado por un gran número de países, establece que siempre, que sea posible, se emplean muestras contaminadas naturalmente con los analitos. De no existir suficientes muestras contaminadas naturalmente, se procederá, como una segunda opción, a contaminar, para el caso de muestras líquidas y semisólidas, con porciones de muestras del mismo tipo naturalmente contaminadas. Debe procederse a la contaminación artificial en casos bien justificados, y esta se realiza con material de referencia o, de no estar disponible, entonces, se procede a la contaminación artificial con cepas aisladas de la matriz objeto de análisis.

Es necesario tener en cuenta aspectos relacionados con los niveles de inóculo y de estrés del microorganismo, orientados siempre a tratar que la muestra artificialmente contaminada sea similar a la que se puede encontrar en condiciones reales, lo que en definitiva da una idea más fiel del comportamiento del nuevo método, y si este satisface o no las expectativas.

Fuentes de incerteza en las matrices para ensayos de validación

Existen aspectos de variabilidad de los microorganismos que se debe poner en consideración cuando se estén comparando los resultados obtenidos en la validación de un método alternativo pues pueden conducir a incertezas en las mediciones. Tal es el caso de la distribución de los microorganismos en la muestra o matriz objeto de ensayo.

Tillet y Lightfoot, en 1995,¹⁸ y posteriormente la BSI en el 2003,¹⁹ plantearon que los microorganismos no son iones, que para análisis químicos pueden ser considerados homogéneamente distribuidos. Los microorganismos, al ser organismos vivos, cuando son introducidos en agua, no forman una solución perfecta, sino una suspensión, lo cual le imparte un grado significativo de heterogeneidad inherente.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que existe variabilidad entre microorganismos de diferentes géneros y especies. Algunos presentan características como, por ejemplo, la motilidad, que puede hacer que este se concentre más en alguna porción de la muestra; pueden estar en diferentes estadios de desarrollo y aquellos, que hayan muerto, no pueden ser detectados por algunos métodos alternativos, ocupando sin embargo un lugar en la matriz. También el grado de estrés puede ser diferente por estar la muestra almacenada en condiciones de temperaturas bajas, entre otros factores. Además, existe variabilidad entre el grado de contaminación de las matrices y la interacción del microorganismo de interés con la microflora acompañante, la cual pudiera tener, también, un efecto en la distribución de este en la muestra.

Una de las mayores fuentes de incerteza es la distribución de los microorganismos en la muestra y la forma en la cual es tomada esa muestra para el análisis.²⁰

El recuento de bacterias obtenido, luego de haber analizado una muestra de alimentos, frecuentemente se aproxima a una distribución lognormal y, algunas veces, a una distribución *poisson*, en la cual la varianza entre el valor de las réplicas iguala a la media analítica de estos valores. En este caso, es necesario,

antes del análisis estadístico, transformar los datos a logaritmos y considerar, en un segundo caso, una transformación de los datos al valor de raíz cuadrada, para así aproximarlos a una distribución normal.¹⁹ Desafortunadamente, existen muchas circunstancias donde los recuentos conforman una distribución binomial negativa para la cual dicha transformación es más compleja.^{21,22}

Fases de la validación

Los estudios de validación son divididos usualmente en 2 fases.

Según ISO¹ y NordVal,¹¹ la primera fase es un *estudio de comparación de método*, del método alternativo contra el método de referencia, y es desarrollado por el laboratorio organizador. AOAC¹² la nombra como *estudio prelaborativo*, y otras normas como ISO 13843,²³ específica para la validación de métodos microbiológicos en aguas, definen la primera fase de validación como *primaria*.

Todas coinciden en el criterio de que esta primera fase de la validación tiene como objetivo principal proporcionar toda la información posible respecto al nuevo método, objeto de estudio, el recobrado y/o enumeración del microorganismo diana, rangos óptimos de concentraciones del microorganismo en la muestra donde se obtengan los resultados más satisfactorios, la selectividad y especificidad (falsos positivos y negativos), incertezas de recuento (analista y metodológica), y un estimado general de precisión. Además, se pueden analizar los requerimientos del método como tiempo y temperatura de incubación, preparación del medio y condiciones de almacenamiento, almacenamiento y pre-tratamiento de la muestra.²⁴

La segunda fase de la validación, según NordVal,¹¹ consiste en un *estudio colaborativo*, considerado de igual manera por AOAC Internacional,¹² aunque este último además lo define como *estudio colaborativo interlaboratorio*. ISO¹ refiere esta fase como *estudio interlaboratorio*, y la norma ISO 13843²³ para microbiología en aguas como *verificación (validación secundaria)*.

NordVal¹¹ e ISO¹ definen el objetivo de esta fase como: determinar la variabilidad de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios utilizando muestras idénticas, añadiendo la norma ISO que estos resultados, además, serán comparados con aquellos obtenidos en el *estudio de comparación de métodos*. Para la AOAC Internacional,¹² el propósito es proveer un estimado real de los atributos del método, particularmente en las desviaciones sistemáticas y aleatorias, esperadas cuando el método sea utilizado en la práctica diaria.

El propósito de la *validación secundaria* es establecer si el nuevo método satisface realmente las necesidades del laboratorio.²⁴

Esta fase de la validación es organizada y controlada por el laboratorio experto, pero desarrollada en otros laboratorios colaboradores y tiene como objetivo principal observar el comportamiento del método utilizando muestras comunes, así como situaciones que pudieran ocurrir cuando el uso del método sea extendido a la práctica.²⁵

Ambas fases de validación son aplicadas a métodos analíticos cualitativos cuya respuesta es la presencia o ausencia del analito, detectado directa o indirectamente en una cantidad determinada de muestra.¹

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO MICROBIOLÓGICO ALTERNATIVO CUALITATIVO

Etapa intra-laboratorial

Los métodos microbiológicos cualitativos son usualmente aplicados al control de la calidad de alimentos y aguas donde la simple presencia del microorganismo en la muestra es significativa e independiente de su recuento. Existen estudios referidos a la aplicación de estos métodos en pruebas de esterilidad en la industria farmacéutica,²⁶ donde se afirma que es entendible que se desee encontrar un esquema de validación que se ajuste a todas las aplicaciones, pero que esto es imposible, pues todas las tecnologías tienen sus propias peculiaridades.

Los parámetros establecidos, según ISO¹ son:

- *Exactitud relativa* (AC): grado de correspondencia entre las respuestas obtenidas por los métodos de referencia y alternativo en muestras idénticas. El término "exactitud relativa" es complementario a la exactitud y la veracidad, siendo la exactitud la cercanía de acuerdo entre un resultado y el valor de referencia aceptado; y la veracidad, la cercanía de acuerdo entre el valor promedio obtenido a partir de una serie de resultados y el valor de referencia. Para la determinación de estos parámetros, el valor de referencia aceptado es el valor obtenido por el método de referencia. Por lo tanto, el término "relativo" implica que el método de referencia no provee automáticamente el valor de referencia aceptado.
- *Desviación positiva* (PD): el método alternativo muestra una desviación positiva, si provee un resultado positivo, mientras que el método de referencia brinda un resultado negativo. Una desviación positiva se convierte en un falso positivo cuando el verdadero resultado puede ser comprobado como negativo. Una desviación negativa es considerada como verdadero positivo cuando el resultado positivo puede ser corroborado como positivo.
- *Desviación negativa* (ND): el método alternativo presenta una desviación negativa si provee un resultado negativo cuando el método de referencia brinda un resultado positivo. Una desviación negativa se convierte en un falso negativo cuando el verdadero resultado puede ser comprobado como positivo.

En la práctica, para comprobar los resultados del método de referencia, se aplican pruebas adicionales de confirmación. Por ejemplo, en el caso de los medios de cultivo, colonias aisladas en el medio de referencia son sometidas a identificación por un conjunto de pruebas bioquímicas recomendadas en las normas o en la literatura científica.

- *Sensibilidad relativa* (SE): habilidad del método alternativo cualitativo para detectar el analito cuando es detectado por el método de referencia.

- *Especificidad relativa* (SP): habilidad del método alternativo cualitativo de detectar el analito cuando no es detectado por el método de referencia.

Para el cálculo de estos parámetros, según el protocolo de medición establecido en

el estándar ISO 16140,¹ se le da prioridad al análisis de muestras naturalmente contaminadas. Si el método alternativo, objeto de estudio, es propuesto para el análisis de cualquier alimento, entonces deben analizarse 5 categorías de alimentos (productos cárnicos, pescado y otros productos del mar, frutas y vegetales, entre otras). En caso de que el método alternativo esté propuesto para menos aplicaciones, deben ser analizadas las categorías correspondientes a estas. Se analizan por categoría 60 muestras, teniendo en cuenta que por cada categoría se incluye el análisis de 3 tipos de alimentos típicos pertenecientes a ella. Es recomendable que sean analizadas muestras de una distribución geográfica lo más amplia posible para evitar factores locales predisponentes. Lo aconsejable es obtener 50 % de resultados positivos y 50 % de resultados negativos.

Las muestras ambientales y veterinarias constituyen cada una categorías independientes.

Para el cálculo de *exactitud relativa* (AC), *sensibilidad relativa* (SE) y *especificidad relativa* (SP), se organizan los resultados obtenidos tanto por el método de referencia como por el método alternativo (tabla 1).

Tabla 1. Resultados pareados del método alternativo y de referencia

Respuestas	Positivos por el método de referencia (R+)	Negativos por el método de referencia (R-)
Positivos por el método alternativo (A+)	+/+ Concordancia de los positivos (PA)	Desviación positiva (PD) (R-/A+)
Negativos por el método alternativo (A-)	+/- Desviación de los negativos (ND) (A-/R+)	Concordancia de los negativos (NA)

Para cada porcentaje (p) de los parámetros a determinar, se deben calcular los intervalos de confianza (CI) y además se analizan los resultados discordantes (Y). Este último parámetro se calcula aplicando el *test* de McNemar^{26,27} para el caso de tener más de 22 resultados discordantes, siendo Y la suma de los valores de desviaciones positivas (PD) y negativas (ND) (tabla 2).

Tabla 2. Resultados de la exactitud relativa, sensibilidad relativa y especificidad relativa

Matrices	PA	NA	ND	PD	Sum	Exactitud relativa AC (%)	N+	Sensibilidad relativa SE (%)	N-	Especificidad relativa SP (%)
					N	$\frac{100 \times (PA+NA)}{N}$	PA+ND	$\frac{100 \times PA}{N+}$	NA+PD	$\frac{100 \times NA}{N-}$
Categoría 1										
Categoría 2										
Categoría 3										
Categoría 4										
Categoría 5										
Categoría 6										
Categoría 7										
Total										

PA: concordancia de los positivos; PD: desviación positiva; ND: desviación de los negativos;
NA: concordancia de los negativos.

Nivel de detección relativo: número más pequeño de UFC de los microorganismos que puede ser detectado en el 50 % de los casos por los métodos alternativos y de referencia.

Para la determinación de este indicador se emplea solamente una matriz por cada categoría de alimento y se utilizan, de ser posible, microorganismos diferentes asociados con cada categoría de alimentos. Se recomienda analizar al menos 3 niveles de contaminación. El primer nivel debe ser el nivel teórico de detección y se incluye un control negativo. Se replican 6 veces cada combinación alimento-nivel de contaminación por ambos métodos, partiendo de una muestra inicial.

Inclusividad: habilidad del método alternativo de detectar el analito entre un amplio rango de cepas.

Exclusividad: falta de interferencia de un rango relevante de cepas no diana en el método alternativo.

El ensayo inclusividad-exclusividad se realiza con cepas caracterizadas bioquímica y serológicamente y preferentemente aisladas de alimentos. Los detalles del aislamiento deberán también ser archivados, o sea tipo de alimento, procedencia, entre otros. Para el análisis del microorganismo de interés o diana, se deben seleccionar 50 cultivos puros relevantes para el método alternativo y la matriz utilizada. Para el caso de *Salmonella*, se seleccionan al menos 30 cultivos puros. Por otra parte, se seleccionan 30 microorganismos que no son de interés, pero que pudieran causar interferencia con este y otros que están comúnmente presentes en el tipo de alimento que se analiza. Se parten de diluciones del microorganismo, no de alimentos, y el nivel de inóculo deberá ser de 10-100 veces superior al nivel de detección relativo mínimo. En el caso que alguna cepa aportara algún resultado falso negativo o dudoso, se debe repetir el ensayo siguiendo el protocolo establecido. El método de referencia solo se inocula una vez. Los resultados son presentados en forma de tabla comparativa.

La importancia de los ensayos inclusividad-exclusividad radica en obtener y documentar una amplia información sobre el funcionamiento del método alternativo, sobre todo el comportamiento que pudiera observarse tanto del microorganismo de interés como de otros que pueden o no ser encontrados en las matrices analizadas en el estudio de validación y que posteriormente se convertirán en los productos evaluados rutinariamente en las industrias en las cuales sea implementado el diagnosticador.

Etapas inter-laboratorial

La etapa inter-laboratorial permite determinar la variabilidad de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios analizando muestras idénticas y comparar estos resultados con aquellos obtenidos en el estudio de comparación de métodos.

En esta fase se incluye, además de las muestras contaminadas, muestras "controles", que se analizan, no solo como comprobación de la ausencia del analito, sino también para comprobar la integridad y la ausencia de cambios durante la transportación y conservación.

Para la preparación de las muestras controles, se debe demostrar previamente la ausencia del microorganismo de interés en la misma por parte del laboratorio organizador. En el caso de las muestras positivas (conteniendo el analito de interés), deben ser utilizadas para el estudio colaborativo muestras naturalmente contaminadas. Solo cuando el número de muestras naturalmente contaminadas no sea suficiente para abarcar la totalidad del estudio, se puede acudir a la contaminación artificial de estas. En caso del uso de materiales de referencia (material de referencia certificado que contiene niveles del microorganismo diana apropiados y bien definidos) en los estudios cualitativos, este estará limitado a los casos en que unas pocas cepas o serotipos provenientes de alimentos estén disponibles como material de referencia. El microorganismo debe tener la capacidad de poder ser homogeneizado y mantenerse estable durante el análisis. Los estudios de estabilidad y homogeneidad se llevan a cabo antes de que las muestras sean empleadas en el estudio por el laboratorio organizador.

Por otra parte, las muestras de alimentos deben contener una microflora acompañante o componentes interferentes que también debe mantenerse estable durante el análisis. Según la norma ISO 16140, se utiliza al menos una categoría de alimentos (con previa determinación de su calidad adecuada). La cepa utilizada para la contaminación debe ser representativa del género, teniendo establecido de antemano su crecimiento promedio, características antigénicas y su sensibilidad ante agentes hostiles, entre otros atributos.^{1,28}

El laboratorio organizador deberá garantizar la distribución a los laboratorios colaboradores de las muestras y estos deberán tener todas las condiciones requeridas para realizar el estudio sin dificultades. Los laboratorios participantes deben conocer todos los detalles del funcionamiento de los métodos, así como de las condiciones operativas y reactivos a ser utilizados, y están en obligación de reportar todos los datos que sean requeridos sin omitir detalles por insignificantes que estos puedan parecer, sin desechar resultados, pues es el laboratorio organizador el encargado del análisis de los mismos.^{1,29}

Los parámetros a calcular, una vez obtenidos los datos de los laboratorios por ambos métodos, son los *porcentajes de especificidad* (SP), *sensibilidad* (SE) y la *exactitud relativa* (AC) entre ambos métodos. Se calculan, además, los intervalos

de confianza y se analizan los resultados discordantes según el procedimiento descrito para en la primera fase de la validación.

Para detectar la variabilidad en cada laboratorio y entre estos, se emplean los criterios conformidad (*accordance*), concordancia (*concordance*) y razón de *odds* de la concordancia (*concordance odds ratio*).^{1,30,31}

La conformidad es el porcentaje de la oportunidad de encontrar el mismo resultado (por ejemplo, ambos positivos o ambos negativos) a partir de 2 porciones de ensayo idénticas, analizadas en el mismo laboratorio, bajo condiciones de repetibilidad.

Ejemplo de esto es un laboratorista que use el mismo equipo y los mismos reactivos, en el menor intervalo de tiempo factible.

La concordancia es el porcentaje de oportunidad de detectar el mismo resultado a partir de 2 muestras idénticas analizadas en 2 laboratorios diferentes.

Los criterios de reproducibilidad y repetibilidad miden la diferencia probable entre 2 muestras enviadas al mismo o a diferentes laboratorios. Debido a que los métodos cualitativos no arrojan datos numéricos, como es el caso de los cuantitativos, donde aparecen recuentos de unidades formadoras de colonias o medición de algún parámetro indirecto, la estadística para los métodos cualitativos se basa en la probabilidad, expresada en porcentaje, de que ambas muestras produzcan el mismo resultado.

Si la concordancia es menor que la conformidad, esto indica que 2 muestras idénticas son más propensas a mostrar el mismo resultado si son analizadas por el mismo laboratorio, que si estas son analizadas por diferentes laboratorios. En este caso, se sugiere que puede existir variabilidad en el desempeño entre los laboratorios. Desafortunadamente, la magnitud de la concordancia y de la conformidad depende significativamente del nivel de exactitud, haciendo difícil evaluar el grado de variación inter-laboratorio. Es, por lo tanto, de utilidad, calcular la razón de las desigualdades de la concordancia (COR), teniendo en cuenta la razón entre conformidad y concordancia. Mientras mayor sea este valor así lo será la variación entre laboratorios, aunque se espera un valor ideal igual a 1.

Scotter y otros,³² en el año 2001, plantean como objetivo adicional de su proyecto de validación, utilizar una nueva serie de parámetros para indicar la precisión de los métodos microbiológicos cualitativos, refiriéndose a la concordancia y la conformidad. Leuschner y otros,³³ en 2004, incorporan en su análisis estadístico, además, la determinación de la razón entre ambos parámetros, al igual que Malorny³⁴ en su estudio de validación multicéntrico en 2007.

En Cuba, se ha dado los primeros pasos en el tema con validaciones de nuevos métodos en varios centros investigativos. Ortega y otros en el 2009, validaron un método cromogénico para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de productos de mar, concluyendo que el método alternativo resultó equivalente al método según el procedimiento estándar establecido internacionalmente. (Ortega M, Rodríguez C, Zhuerbenko R. Método cromogénico para la detección de *Salmonella* spp. Congreso Biotecnología Habana 2009. Aplicaciones médicas de la Biotecnología. Noviembre 2-5, La Habana, Cuba).

En el año 2007, Rodríguez y otros³⁵ realizaron un estudio de validación de un método cromogénico y fluorogénico de filtración por membrana, demostrando su semejanza con el método del número más probable (NMP) para *E. coli* en muestras

de agua natural y artificialmente contaminadas. Con aplicaciones clínicas, *Betancourt* y otros desarrollaron una prueba rápida para la detección de infecciones vaginales validado con resultados satisfactorios. (*Betancourt A, Lorenzo M, Villoch A, Fernandez O, Sánchez L*. Validación de método analítico de respuesta binaria. II Seminario Internacional de Salud Animal. VI Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias, Cuba, 10-13 abril, 2007).

Lobaina y otros en 2009 , por su parte, demostraron la equivalencia de 2 métodos (cromogénico y cromogénico-fluorogénico) para la detección e identificación de especies de *Candida*. (*Lobaina T, Rodríguez C, Zhurbenko R, Zayas Y, Viera DR, Cabrera AL*, et al. Identificación de las especies de *Candida* con los medios cromogénicos-fluorogénicos CromoCen CND-C y CromoCen CND-F. Congreso Biotecnología Habana 2009. Aplicaciones médicas de la Biotecnología. Noviembre 2-5, La Habana, Cuba).

CONSIDERACIONES FINALES

Los métodos alternativos constituyen un recurso de mucha utilidad para la detección de microorganismos de interés en muestras de diferentes orígenes. Las validaciones de estos constituyen, sin duda, un proceso complejo y minucioso, donde debe existir, sobre todo, una buena organización del estudio. Sus resultados pueden contribuir a la utilización de nuevos métodos más rápidos y seguros en una amplia variedad de aplicaciones con un impacto importante.

El tema de validación de métodos alternativos sigue en constante desarrollo, y hasta la actualidad se han validado gran cantidad de métodos que hoy se comercializan mundialmente y que favorecen directamente al hombre.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ISO 16140. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods. Geneva: ISO; 2003.
2. United States Pharmacopeial Convention USP XXII, NF XVII - Inc. Rockville: United States Pharmacopeia Convention; 1990.
3. Food and Drug Administration. Guideline for Submitting Samples and Analytical Data for Method Validation. US Government Printing Office; 1990.
4. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Comparability Protocols - Chemistry, Manufacturing, and Controls Information. Draft Guidance 2003. Disponible en: URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
5. Calpena AC, Escribano E, Fernández C. Validación de los métodos analíticos. *Farm Clin* 1991;7(9):749-58.
6. Rampazoo P. Standardisation and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry. *Il Farmacol* 1990;45:807-15.

7. United States Pharmacopeia. Validation of Alternative Microbiological Methods. USP 31 NF-26. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, Md.; 2008.
8. United States Pharmacopeia. USP 23 NF-18. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, Md.; 1994.
9. International Conference on Harmonisation. Draft Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, Federal Register. International Conference on Harmonisation; 1995.
10. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration; 1994.
11. NordVal Validation NV-DOC. D-2002-10-22. Protocol for Validation of alternative microbiological methods. Denmark: NordVal Validation; 2002.
12. Feldsine P, Abeyta C, Andrews WH. AOAC International methods Comité Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. J AOAC Int 2002;85(5):1187-200.
13. Resolución No. 41. Validación de Métodos Analíticos. La Habana: CECMED; 2007.
14. European Commission. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on Criteria for Evaluation of Methods of *Salmonella* Detection. European Commission; 2002.
15. ISO/CD 17994. Water Quality-Criteria for the establishment of equivalence, between microbiological methods. Geneva: ISO; 2001.
16. Wallace H. Andrews. AOAC INTERNATIONAL three validation programs for methods used in the microbiological analysis of foods. Trends Food Sci Technol 1996;7(5):147-51.
17. Appendix D. Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. AOAC International; 2000.
18. Tillet HE, Lightfoot NF. Quality control in environmental microbiology compared with chemistry: What is homogeneous and what is random? Water Sci Technol 1995;31:471-7.
19. Water Quality. Enumeration of micro-organism in water samples.Guidance on the estimation of variations of results with particular reference to the contribution of uncertainty of measurement. London: British Standard Institution; 2003.
20. Corry JEL, Jarvis B, Passmore S, Hedges A. A critical review of measurement of uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. Food Microbiol 2007;24(3):230-53.
21. Jarvis B. Statistical aspects of the microbiological analysis of foods. Progress in industrial microbiology. Vol. 21. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1989.
22. Niemelä SI. A semi-empirical precision control criterion for duplicate microbial colony counts. Lett Appl Microbiol 1996;22:315-9.

23. ISO 13843. Water Quality. Guidance on validation of microbiological methods. Geneva: ISO; 2000.
24. Sartory DP. Validation, verification and comparison: Adopting new methods in water microbiology. Water SA 2005 Jul;31(3):393-6. Disponible en: URL: <http://www.wrc.org.za>
25. Curren RD, Southee JA, Spielmann H, Liebsch M, Fentem JH, Balls M. The role of prevalidation in the development validation and acceptance of alternative methods. ATLA 1995;23:211-7.
26. Sutton S. Validation of alternative microbiology methods for product testing. Quantitative and qualitative assays. Pharm Technol 2005;29(4):118-22.
27. Kanji GK. Statistical test. London: Sage Publications; 1993.
28. Dixon WJ, Massey FJ. Introduction to statistical analysis. 3 ed. New York: McGraw-Hill Book Co.; 1969.
29. ISO 6887 (E). Microbiology General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination. Geneva: ISO; 1983.
30. DD ENV ISO 11133-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media. Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory. Geneva: ISO; 2000.
31. Langton SD, Chevennement R, Nagelkerke N, Lombard B. Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: Accordance and concordance. Int J Food Microbiol 2002;79(3):175-81.
32. Scotter SL, Langton S, Lombard B, Lahellec C, Schulten S, Nagelkerke N, et al. Validation of ISO method 11290 Part 1. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Int J Food Microbiol 2001;64:295-306.
33. Leuschner RGK, Bew J, Boughtflower MP. A collaborative study to evaluate qualitatively powdered baby food validation samples artificially contaminated with *Salmonella* Anatum. Int J Food Microbiol 2004;97:43-51.
34. Malorny B, Dietrich M, Teufel P, Berghof-Jäger C, Huber I, Anderson I, et al. Multicenter validation study of two blockcycler - and one capillary-based real-time PCR methods for the detection of *Salmonella* in milk powder. Int J Food Microbiol 2007;117:211-8.
35. Rodríguez C, Sánchez M, Ortega M, Zhurbenko R, Tsoraeva A, Díaz M, et al. Validation of a membrane chemogenic and fluorogenic filtration method vsMPN method for *E. coli* in water samples. Bioproducciones: desde el desarrollo tecnológico hasta la producción industrial. Revista Biotecnología Habana 2007.

Recibido: 21 de mayo de 2010.
Aprobado: 6 de agosto de 2010.

Lic. *Meylín Ortega González*. Centro Nacional de Biopreparados (BioCen). Apartado 6048, Habana 6, CP 32600. Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf.: 68 2441; Fax: (537) 33 8439. E-Mail: mortega@biocen.cu