

Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Bebidas

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

ANA ISABEL MUÑOZ CAJIAO
OCTUBRE DE 2016

VALIDACIÓN

Confirmación mediante el aporte de pruebas objetivas que se han cumplido los requisitos para el uso pretendido o una aplicación específica. [ISO 9000: 2000]

La validación es siempre un equilibrio entre costos, riesgos y posibilidades técnicas

VERIFICACIÓN (VALIDACIÓN SECUNDARIA)

Demostración experimental que un método establecido funciona de acuerdo con las especificaciones en las manos del usuario

COMPARACIÓN DE MÉTODOS

Demostración experimental que un resultado de un método establecido es semejante al resultado del método de referencia

ATRIBUTOS DEL MÉTODO EN UNA VALIDACION CUANTITATIVA

Especificidad

Sensibilidad

Exactitud

Precision

Precisión intermedia

ATRIBUTOS DEL MÉTODO EN UNA VALIDACION CUANTITATIVA

Límite de detección

Límite de cuantificación

Linearidad

Medición de Incertidumbre

Repetibilidad y Reproducibilidad

Robustez

ATRIBUTOS DEL MÉTODO EN UNA VALIDACION CUALITATIVA

Límite de detección

Sensibilidad

Especificidad

Eficiencia

Exactitud relativa

Sensitividad relativa

Especificidad relativa

Desviación positiva

Desviación negativa

ATRIBUTOS DEL METODO DE UNA VALIDACIÓN CUALITATIVA

Intervalos de confianza

Test de McNemar

Test Ji cuadrado

Inclusividad

Exclusividad

Incertidumbre

Validación de métodos microbiológicos

DEFINICION DE ATRIBUTOS

SENSIBILIDAD: fracción del número total de cultivos o colonias positivas que son asignadas correctamente con el método utilizado
[ISO13843:2000]

ESPECIFICIDAD: fracción del número total de cultivos o colonias negativas que son asignadas correctamente con el método utilizado
[ISO13843:2000]

INCLUSIVIDAD: diferentes microorganismos pertenecientes al grupo deben ser detectados por el método

EXCLUSIVIDAD: diferentes microorganismos que no pertenecen al grupo no deben ser detectados por el método

DEFINICION DE ATRIBUTOS

SENSITIVIDAD RELATIVA: es la habilidad del método alternativo de detectar el microorganismo deseado cuando él es también detectado por el método de referencia

ESPECIFICIDAD RELATIVA : Es la habilidad del método alternativo de no detectar el microorganismo no deseado cuando él también no es detectado por el método de referencia

EXACTITUD RELATIVA : Grado de concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando un método de referencia reconocido.

Validación de métodos microbiológicos

DEFINICION DE ATRIBUTOS

LIMITE DE DETECCION RELATIVO: es el menor número de microorganismos que puede ser detectado en un 50% de las veces por los dos métodos

DESVIACION POSITIVA: ocurre cuando el método alternativo da un resultado positivo sin confirmación y el método de referencia da un resultado negativo. Esta desviación se convierte en un falso positivo cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es negativo

DESVIACION NEGATIVA: ocurre cuando el método alterativo da un resultado negativo sin confirmación y el método de referencia da un resultado positivo . Esta desviación se convierte en un falso negativo cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es positivo

METODO CUALITATIVO

Es un método de análisis cuya respuesta es de presencia o ausencia del analito en una cierta cantidad de muestra

METODO DE REFERENCIA

Método investigado a fondo , describe con claridad y exactitud las condiciones y los procedimientos necesarios para medir los valores de una o más propiedades, y que ha demostrado tener una exactitud y una precisión apropiada para el uso que pretende hacerse del mismo, de manera que pueda utilizarse para evaluar la exactitud de otros métodos empleados para realizar la misma medición y en particular para caracterizar un material de referencia. En general se trata de un método normalizado nacional o internacionalmente.

METODO ALTERNATIVO

Es un método de análisis que demuestra o estima un analito (un microorganismo, sus componentes o su producto) para una categoría dada de productos, como lo hace su correspondiente método de Referencia.

Ventajas:

- La velocidad del análisis y/o respuesta
- La facilidad de ejecución y/o automatización
- Las propiedades analíticas (la precisión, exactitud, el límite de detección)
- La miniaturización
- La reducción de costos

Validación de métodos microbiológicos

QUE SE VALIDA ?

Los métodos no normalizados

Los métodos que diseña o desarrolla el laboratorio

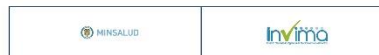
Los métodos normalizados empleados fuera del alcance

¿QUE SE VERIFICA?

Métodos oficiales

Métodos normalizados o métodos de organismos nacionales o internacionales reconocidos

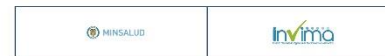
Los métodos alternativos



QUE SE COMPARA?

Un método Alternativo frente a un método de Referencia

La comparación puede ser una forma de validación



VALIDACIÓN MICROBIOLÓGICA CUALITATIVA

Estandarización de la fase estacionaria de la cepa deseada

- Sembrar la cepa deseada y cepas no deseadas en agar TSA-YE e incubar por 18-24 horas a $35^{\circ}\text{C}\pm 2$
- Finalizado el tiempo de incubación hacer un pase en caldo infusión cerebro corazón(BHI) e incubar a $35^{\circ}\text{C}\pm 2$ por 18-24 horas
- Hacer diluciones de la cepa deseada en agua peptonada al 0.1% desde 10^{-1} hasta 10^{-10} , sembrar por profundidad y por duplicado desde la dilución 10^{-6} hasta 10^{-10} con agar Plate Count (PCA) e incubar a $35^{\circ}\text{C}\pm 2$ por 48 horas

Estandarización de la fase estacionaria de la cepa deseada

- Finalizado el tipo de incubación hacer recuento y promediar los resultados de las diluciones
- Conocidas las UFC de cada dilución podemos tomar las que necesitemos para la fortificación de las matrices.
- Con las cepas no deseadas o interferentes se hace el mismo procedimiento para obtención de la fase estacionaria
- Hacer pool de interferentes tomando 1 ml del cultivo en fase estacionaria de cada una de las cepas para obtener 10.000 ufc con las cuales se trabaja la Especificidad, como también si es necesario utilizar como flora acompañante de la Sensibilidad.

Validación microbiológica cualitativa

Proceso de validación

- Límite de detección relativo
- Tamaño de la muestra (n) = (ejemplo) 60
- Determinación de la sensibilidad (ejemplo) tamaño=30
- Determinación de la especificidad (ejemplo) tamaño= 30
- Acuerdos positivos =29
- Acuerdos negativos=28

Resultados

Exactitud Relativa(AC)

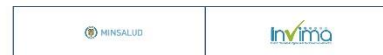
Sensitividad Relativa

Especificidad Relativa

Desviación positiva

Desviación negativa

Informe de validación



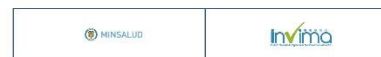
Validación microbiológica cualitativa

Determinación del límite de detección relativo Método de Referencia (MR) - Método Alternativo (MA)

UFC cepa target	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Réplica 4		Réplica 5		Réplica 6		a-b=d
	MR	MA	MR	MA	MR	MA	MR	MA	MR	MA	MR	MA	MR-MA=d
Nivel 1 0UFC/25g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-0 = 0
Nivel 2 1UFC/25g	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	6-1 =5
Nivel 3 2UFC/25g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6-6 = 0
Nivel 4 3UFC/25g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6-6 = 0
Nivel 5 4UFC/25g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6-6 = 0

D = ≤ 4 Seminario taller FAO , o $\geq 50\%$ medida estadística ISO 16140

Límite de detección relativo 2 ufc



Validación microbiológica cualitativa

CALCULO DE RESULTADOS

- Según ISO 16140

Resultado del ensayo	Resultado del ensayo Positivo	Resultado asignado Negativo	Total
Positivo	PA	DP	
Negativo	DN	NA	
Total	SR	ER	

Validación microbiológica cualitativa

CALCULO DE RESULTADOS

- Según ISO 16140

Resultado del ensayo	Resultado del ensayo Positivo	Resultado asignado Negativo	Total
Positivo	PA=29	DP=2	
Negativo	DN=1	NA=28	
Total	PA+ND=30	DP+NA=30	60

N+

N-

Validación microbiológica cualitativa

CALCULO DE RESULTADOS

-SEGÚN ISO 16140

EXACTITUD RELATIVA (AC) =95%

DESVIACIÓN POSITIVA (DP)= 2%

DESVIACIÓN NEGATIVA (DN)= 1%

$$AC = \frac{PA + NA}{N} \times 100 = \frac{28 + 29}{60} = 0,95 \times 100 = 95 \%$$

SENSITIVIDAD RELATIVA (SR)

$$SR = \frac{PA}{N(+)} \times 100 = \frac{29}{30} = 0.96 \times 100 = 96\%$$

ESPECIFICIDAD RELATIVA (ER)

$$ER = \frac{NA}{N(-)} \times 100 = \frac{28}{30} = 0.93 \times 100 = 93 \%$$

INCERTIDUMBRE

- La incertidumbre en una validación de una metodología cualitativa es despreciable por tanto no se tiene en cuenta.
- Solo debe identificarse las distintas fuentes de incertidumbre .
- La incertidumbre en una validación cualitativa se controla a través del procedimiento de aseguramiento de la calidad que debe tener el laboratorio

Validación microbiológica cualitativa

Clasificación del método evaluado:

Aceptado: evaluado en la institución sin estudios interlaboratorios o estudios colaborativos

Recomendado: evaluado con pruebas interlaboratorios o estudios colaborativos

Ejemplo: **MTA/MC – 004/R-06**

MTA = Método de toma de muestras y análisis

MC = Método microbiológico

004 = Número del método

R = Recomendado

2006 = Año de edición del método

. Informe de Validación:

- Descripción del método de ensayo
- Objetivo del método
- Alcance del método
- Definiciones y abreviaturas
- Justificación
- Método
- Fundamento

Informe de Validación:

- Procedimiento de validación el cual incluye todas las etapas de la validación
- Toma de muestras
- Material de referencia
- Control de calidad
- Atributos del método a determinar
- Resultados
- Cálculo de resultados y análisis

Validación microbiológica cualitativa

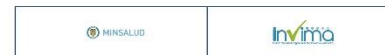
Informe de validación

Conclusiones

Recomendaciones

Clasificación del método

Bibliografía



VALIDACIÓN SECUNDARIA O VERIFICACIÓN

- **Tamaño de muestra**= 28 o 30 muestras , que tenga significado estadístico
- **Atributos del método a considerar:** mínimo 2 atributos a consideración del investigador de acuerdo a la metodología y a cada caso en especial.
- **Ejecución de los atributos:** de igual forma como se desarrolla una validación.
- **Cálculo de resultados** : de igual forma como se hacen en una validación
- **Clasificación de la verificación** : El laboratorio dará un código de igual forma como se asigna a una validación.
- **Informe de la verificación** : Igual como si fuera una validación.

GRACIAS

 MINSALUD

 InVima

