

# SITUACIÓN DE LA VALIDACIÓN DE LOS ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS EN LOS LABORATORIOS.

J. Laso Sánchez<sup>1</sup>

1- Gabinete de Servicios para la Calidad (GSC). C/Cocheras, 4 Portal G Bajo 4 – 28007 Madrid. Tlfno.: 915519252. Fax: 915018898. E-mail: gscsal@gscsal.com

**RESUMEN.** El presente artículo, desea dar una panorámica de la situación actual de los laboratorios españoles sobre la validación interna de los métodos microbiológicos, haciendo hincapié en los problemas más acuciantes presentados, así como las necesidades de herramientas futuras requeridas.

## 1.- Introducción

La validación es “La confirmación mediante examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto”.

En el campo microbiológico y debido a las características propias de los métodos de ensayo, en general se había optado por la utilización de métodos publicados, para evitar el requisito de validación. En algún caso esto producía dificultades, ya que los métodos no eran seguidos estrictamente por ejemplo en cuanto a tolerancias de temperaturas, ó composiciones de medios.

Por otro lado, la información existente sobre características de los métodos, era escasa, y en el periodo 1990-2000, se empieza a poner de manifiesto, a través de ejercicios de intercomparación, que los resultados obtenidos pueden ser dependientes del método utilizado.

Con la publicación de la norma ISO 17025 y la interpretación de la misma realizada por los organismos de acreditación, la validación de los métodos microbiológicos, cobra un papel fundamental, ya que se solicita que se validen internamente también, aquellos métodos que no tienen parámetros definidos, de modo que una vez obtenidos estos, puedan compararse con requisitos preestablecidos que demuestren su aptitud para uso.

Esto hace que en los últimos años, proliferen publicaciones, cursos y artículos sobre este tema.

De hecho en el último periodo se procede a la publicación de un importante número de normas ISO: ISO 13843, ISO 16140, ISO 17994.

Sin embargo las normas publicadas adolecen de un problema de cara a la validación práctica. Su objeto no es la validación interna, sino la normalización de métodos alternativos, ó la introducción de nuevos medios de cultivo, por lo que los experimentos solicitados sobrepasan en número y capacidad de organización los recursos generalmente disponibles en un laboratorio independiente.

Por ello conviene realizar una reflexión sobre las características de la medida microbiológica, y como afectan estas a la validación.

## 2.- Características de la medida microbiológica

La investigación de la presencia/ausencia de microorganismos, ó el recuento de las unidades formadoras de colonias (ufc) en una cantidad determinada de muestra se basan fundamentalmente en:

1) Utilización de una serie de pasos en las que se utilizan medios de composición química específica y temperatura de incubación que permiten seleccionar en función de sus características a unos microorganismos de otros, a través de favorecer ó dificultar su crecimiento.

### ETAPAS DE SELECCIÓN

2) Observación de las características morfológicas y físicas (color ó forma) de los microorganismos en los medios utilizados.

### ETAPAS DE DETECCIÓN

3) Realización de pruebas bioquímicas complementarias, que diferencian unos organismos de otros.

### ETAPAS DE CONFIRMACIÓN

Todo este proceso que es el definido desde siempre para las pruebas microbiológicas presenta las siguientes características diferenciadoras, con respecto a otros procesos de medida.

#### 2.1 Taxonomías imprecisas

En muchos casos no se ha realizado una separación precisa desde un punto de vista taxonómico, e incluso se generan grupos de microorganismos que pueden no estar taxonómicamente relacionados.

#### 2.2 Dependencia del comportamiento

La adscripción a un grupo específico se produce por el comportamiento del individuo, y no por su constitución interna.

Para ello, se ha valorado, como se comportan generalmente individuos típicos de ese grupo.

Esto supone que pueden existir individuos no típicos que se comporten de manera diferente ó que el comportamiento, y por tanto el resultado, pueda depender de la historia reciente (Ej.: cepas estresadas).

### 2.3 Cuantificación de seres vivos

Dado que el objetivo de la medida es un ser vivo, las condiciones de conservación de la muestra, son muy importantes, y es difícil garantizar la estabilidad de un valor de referencia (necesario para pruebas de exactitud) por un largo periodo de tiempo (necesario para pruebas de reproducibilidad), a no ser que se utilicen técnicas especiales. Ejemplo: liofilización.

### 2.4 Influencia de otros microorganismos

La presencia ó ausencia de microorganismos acompañantes, puede alterar los resultados esperados debido a factores tales como:

- Competencia en el uso de los recursos requeridos para crecimiento.
- Enmascaramiento de la reacción del microorganismo objetivo.
- Comportamiento similar al microorganismo objetivo.

### 2.5 Falta de referencias comunes internacionales

Dado que el número de microorganismos obtenido depende de las condiciones: medio de cultivo, tiempo y temperatura de incubación, los valores de referencia son dependientes de su método de obtención y solo se puede hablar de recuperaciones relativas.

### 2.6 Pequeños números y distribuciones

Los recuentos ó contajes en general se realizan sobre placas que contienen un número pequeño de ufc's, menor de 200, de otro modo existirían dificultades para realizarlos.

Esto plantea problemas importantes sobre todo cuando existe un número pequeño inferior a 15 ufc's, porque la distribución es discreta (15 ó 14 ufc's) y no continua como en el caso de la química. Por ello el modelo de distribución gaussiano, no es aplicable, y debe utilizarse otro tipo de distribuciones como Poisson ó binomial negativa.

Esta característica supone que en las zonas de bajos recuentos no tendremos garantía cuantitativa de nuestros resultados, pudiendo incluso obtener resultados de cero por la propia libertad de las colonias, de situarse, en el mililitro de la solución contiguo al que tomamos para hacer las diluciones.

## 3.- Parámetros de validación

Los parámetros de validación son aquellas características del método para las que:

- a) Se definen requisitos.
- b) Se realizan experimentos para conseguirlos.
- c) Se valoran los resultados obtenidos frente a requisitos para poder declarar válido el método.

Los parámetros dependerán del tipo de método utilizado y definirán aquellas características que sean útiles para el uso previsto.

### 3.1 Tipos de métodos

En el análisis microbiológico existen diferentes tipos de métodos:

#### a) Métodos cualitativos.

Su objetivo es detectar la presencia ó ausencia de un microorganismo objetivo en una cantidad determinada de muestra.

#### b) Métodos cuantitativos.

Su objetivo es detectar un valor numérico (nº ufc/unidades de alimento), de un microorganismo objetivo. Dentro de esta categoría se pueden distinguir:

b1) Métodos NMP. Que utilizan la estadística para realizar una estimación del valor numérico.

Realmente se trata de métodos semicuantitativos.

b2) Métodos de recuento. Se realiza un contaje real de las unidades formadoras de colonias, existentes en el cultivo final.

### 3.2 Parámetros de métodos cualitativos

Dados los objetivos de estos métodos, estaremos interesados en:

a) Estar seguros que detectamos pequeñas cantidades de microorganismos.

b) Estar seguros que la presencia de otros microorganismos, ó la presencia de matrices diferentes no produce resultados falsos (positivos ó negativos).

Por ello los parámetros requeridos para estos métodos pueden ser:

- Límite de detección
- Falsos positivos
- Falsos negativos
- Sensibilidad
- Especificidad
- Eficiencia.

Que según las definiciones de la ISO 13843 son:

#### 1) Límite de detección.

Número de partículas por porción analítica cuya probabilidad p0 de obtener un resultado negativo es igual al 5%, o al asignado.

NOTA 1 – Probabilidad de un resultado positivo p(+) = 1 - p0.

NOTA 2 - Cálculo de x a través de una distribución de POISSON

$$x = \ln \left[ \frac{1}{p.} \right] = \ln \left[ \frac{1}{0,05} \right] = \ln(20) = 3,00 \quad (1)$$

#### 2) Falsos positivos.

Cuando el método alternativo da un resultado positivo sin confirmación y el método de referencia da un resultado negativo. Cuando resultado verdadero es negativo.

#### 3) Falsos negativos.

Cuando el método alternativo da un resultado negativo sin confirmación y el método de referencia da un resultado positivo. Cuando resultado verdadero es positivo.

4) Sensibilidad: Fracción del número total de colonias positivas correctamente asignado en la inspección previa.

5) Especificidad: Fracción total del número de colonias negativas asignado correctamente en la inspección previa.

6) Eficiencia: Fracción del total de experimentos en los que los resultados finales coinciden con los asignados en la inspección previa.

### 3.2.1 Requisitos para parámetros cualitativos

#### 3.2.1.1 Límite de detección

Los requisitos suponen la definición de un valor mínimo de ufc detectado, con una probabilidad determinada.

Para fijar criterios hay que valorar:

a) La probabilidad de detección exigida no puede ser mayor del 90%, para asegurar que no se exigen más de 10 repeticiones por nivel.

b) Cuando el número de ufc's es pequeño la distribución de Poisson, supone que pueden encontrarse porciones, sin microorganismo por lo que el número mínimo de ufc's para detectar, debe ser razonable en torno a 10 ó 5 ufc's.

#### 3.2.1.2 Otros parámetros

Los requisitos para asegurar la correcta detección de casos positivos y negativos dependerá del número de muestras que razonablemente se puedan exigir.

Inicialmente se podrían establecer los siguientes criterios:

-Sensibilidad, selectividad: 90%

-Falsos positivos y/o negativos: 90%

-Eficacia: 90%

### 3.2.2 Sistema de obtención de parámetros

Para la obtención de los parámetros deberemos disponer de muestras con valor de referencia (Ver apartado 4).

En el caso de límite de detección deberemos disponer de muestras con valores de referencia iguales ó menores al nº de ufc's establecido como límite en una cantidad adecuada para cumplir el criterio de probabilidad establecido.

Un sistema es el dopaje de muestras estériles con volúmenes de una suspensión de cepas de colección de cultivo de la que conocemos su valor de referencia mediante su cultivo en condiciones normalizadas, y el análisis de dichas muestras para valorar presencia ó ausencia.

Ejemplo: Si deseamos verificar que nuestro método de Salmonella tiene un límite de detección inferior a 5 ufc's, con una probabilidad de detección del 90%.

Prepararemos al menos 10 muestras de por ejemplo 3 niveles de concentración (10, 5, 3 ufc's por 25 g) y las analizaremos obteniendo:

**Tabla 1.**

Nivel	Nº presencia	Nº ausencias	Probabilidad detección
10	10	0	100%
5	9	1	90%
3	7	3	70%
Por tanto nuestro límite es 5.			

Para el resto de los parámetros se dispondrá de al menos 10 muestras positivas y 10 negativas, que incluyan otros microorganismos acompañantes, que puedan interferir, por ejemplo: *Listeria innocua* para *Listeria monocytogenes*, etc... Dichas muestras serán analizadas con el método que se pretende validar.

Los resultados obtenidos se clasificarán de acuerdo a lo indicado en la norma ISO 13843 como:

**Tabla 2.**

	Valor método a validar			
	Muestra +	Muestra -		
Valor inicial	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d

Se calcularán los parámetros requeridos como:

-Sensibilidad =  $a/(a+b)$  porcentaje positivos reales correctamente asignados.

-Especificidad =  $d/(c+d)$  porcentaje de negativos reales correctamente asignados.

-Falsos positivos =  $c/(a+c)$  porcentaje de positivos detectados incorrectamente asignados.

-Falsos negativos =  $b/(b+d)$  porcentaje de negativos detectados incorrectamente asignados.

-Eficiencia (e)  $E = (a+d)/n$  Aciertos respecto de casos totales.

### 3.3 Parámetros cuantitativos

En el caso de análisis cuantitativos, ya sean de recuento directo ó NMP, los objetivos previstos inicialmente deberían ser:

1) Que todos los laboratorios den resultados iguales para muestras con cargas similares.

2) Que los resultados sean repetibles.

3) Que no hay errores en la asignación de microorganismos.

Por ellos los parámetros requeridos serán:

a) Exactitud, expresada como recuperación, y que dependerá siempre del sistema con el que se ha obtenido, el valor de referencia.

b) Precisión expresada como coeficiente de variación de reproducibilidad.

-Definición exactitud: Grado de concordancia entre el resultado de la medición y el valor de referencia aceptado

NOTA: El término "exactitud" cuando se aplica a un conjunto de resultados de mediciones implica la combinación de los componentes aleatorios y de un error sistemático común o de un componente del sesgo. (ISO 5725-1, 3.6:94) (ISO 3534-1, 3.11:93)

El resultado final se puede expresar como:

$$\text{Recuperación} = \frac{\text{Valor Obtenido}}{\text{Valor Referencia}} \cdot 100 \quad (2)$$

-Definición precisión: "El grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento

experimental repetidas veces bajo las condiciones establecidas".

### 3.3.1 Parámetros adicionales, que no son de aplicación en el campo microbiológico.

#### 3.3.1.1 Linealidad

Que en general se aplica a métodos instrumentales, por lo que no tiene sentido en microbiología.

Se ha especulado con su uso para valorar el mantenimiento de exactitud y reproducibilidad a partir de diluciones.

#### 3.3.1.2 Rango de medida

En cuanto a límite superior, depende del número de ufc's que pueden detectarse en una placa, sin problemas de invasión ó dificultad de recuento. Puede estimarse a partir de experimentos pero en muchos casos, y dado que los métodos microbiológicos están basados en normas pueden tomarse los criterios establecidos en las mismas en torno a 150 – 200 ufc's, dependiendo del método.

En cuanto a límite inferior también llamado límite de cuantificación con el seguimiento de la distribución de Poisson, para pequeño número de unidades formadoras de colonias, ya las normas indican que teóricamente podrá oscilar entre 15 y 20 ufc's dependiendo de los requisitos de exactitud y precisión solicitados.

-Definición límite de cuantificación aplicado a análisis microbiológicos cuantitativos: Número mínimo de microorganismos dentro de una variabilidad definida que puede determinarse en las condiciones experimentales del método evaluado.

El autor considera que no es de utilidad mientras no puede ser utilizado en la expresión de resultados (Ver apartado 5.2).

### 3.3.2 Requisitos para parámetros cuantitativos

#### 3.3.2.1 Recuperación relativa

El valor aceptable dependerá de:

- El sistema de obtención del valor de referencia.
- El número de repeticiones realizadas.
- El tipo de método recuento ó NMP.

En el caso de métodos de recuento, con valores de referencia obtenidos de Materiales de referencia, métodos alternativos ó intercomparaciones, es aconsejable que se obtengan resultados similares y por tanto la recuperación suponga al menos el 90%.

En el caso de métodos de recuento cuyos rangos de referencia provengan de dopaje de soluciones estandarizadas puede existir una influencia de la recuperación del medio selectivo frente a un medio no selectivo, lo que obligue a aceptar valores inferiores por ejemplo 60%.

En el caso de métodos NMP, la propia variabilidad del método (elevada), y el pequeño número de repeticiones que

es posible realizar ( 10 ó 20) pueden requerir establecer criterios de aceptación en torno a 75%.

#### 3.3.2.2 Precisión

Los criterios de precisión aceptable estarán basados, en el modelo de distribución que se asume siguen las dispersiones de ufc's.

Por ello suponiendo que siguen una distribución de Poisson.

$$CV = \frac{1}{\sqrt{NU}} \cdot 100 \quad (3)$$

Siendo NU – el número de unidades formadoras de colonias.

Teniendo en cuenta que este coeficiente de variación, es teórico, se aconseja aumentar el intervalo de aceptación, admitiendo que el laboratorio realiza operaciones que pueden aumentar la variabilidad teórica.

El autor propone aceptar valores que suponen un aumento del 20% de la variabilidad teórica por lo que el coeficiente aceptable sería:

$$CV_{\text{máximo}} = \frac{120}{\sqrt{NU}} \quad (4)$$

Para el caso de métodos NMP, la distribución no sigue la de Poisson.

Cochran realizó una aproximación teórica calculando la desviación estándar en logaritmos (Bibliografía 2).

Este valor da lugar a unos CV<sub>aproximados</sub> del 40%.

### 3.3.3 Obtención de valores de las características

El problema fundamental para obtener valores, es debido a la falta de estabilidad de las muestras microbiológicas.

Por ello, en principio, es difícil conseguir valores de precisión en reproducibilidad.

Sin embargo se han desarrollado técnicas que permiten valorar la precisión, mediante la comparación de un conjunto de pares de valores.

El sistema se basa en obtener un conjunto de pares en el que:

-Valor 1, es el valor de referencia.

-Valor 2, es el del método a validar.

A partir de este conjunto se realiza una transformación, sustituyendo los valores por sus logaritmos, y se calcula la diferencia de cada pareja.

La diferencia media está relacionada con la recuperación, una vez invertida la transformación.

La desviación estándar de las diferencias está relacionada con el valor del coeficiente de variación de reproducibilidad.

Una sistemática más completa se desarrolla en la referencia bibliográfica.

#### 4.- Tipos de muestras para obtención de valores de referencia

La validación ya sea de métodos cualitativos como de cuantitativos requiere disponer de muestras con un valor de referencia conocido (positivo/negativo ó valor de recuento) que siempre será relativo a la fuente de obtención.

Por ello es necesario definir las características de dichas muestras y las fuentes de donde deben ser obtenidas.

##### 4.1 Características

a) Las muestras deberían contener matriz (alimento, agua, etc...) representativa de lo que se desea analizar, para valorar el comportamiento físico-químico de nuestro proceso, dificultad de homogenización, reacciones inespecíficas, etc...

b) Las muestras deberían incluir en general microorganismos acompañantes, que pueden ser naturales, ó adicionadas artificialmente.

Las acompañantes deberían ser de dos tipos:

b1) Organismos similares al objetivo que demuestran la selectividad del método. Por ejemplo: coliformes no fecales, para método de coliforme fecal, *Shigella* spp para *Salmonella* spp, *Listeria innocua* para método *Listeria monocytogenes*. Generalmente deben ser adicionadas.

b2) Otra flora acompañante habitual. Ejemplo *Pseudomonas*. Generalmente se obtiene de muestras naturales. En algún caso es necesario adicionarla porque debe partirse de muestra estéril ante la dificultad ó inseguridad de disponer de muestras en las que conozcamos el valor del microorganismo objetivo ó su ausencia.

c) Cuando se trate de muestras con valores de referencia para validación de métodos cuantitativos es aconsejable que los valores sean tales que los de recuentos superen las 30 ufc's en placa para evitar la influencia de las distribuciones de POISSON ó binomial en los resultados de los recuentos.

Probablemente no es necesario que superen el valor más alto de recuento en placa (por ejemplo 200), ya que en ese caso estaríamos validando, la capacidad del laboratorio de realizar diluciones.

d) En el caso de límites de detección de métodos cualitativos requerirán muestras de varios niveles descendentes del microorganismo objetivo y sin flora acompañante para valorar la capacidad del método sin interferencias.

En el caso de otros parámetros cualitativos los niveles del microorganismo objetivo deben ser superiores a los de la zona de detección y deben ir acompañados de microorganismos naturales e interferentes para poder valorar las características del método.

##### 4.2 Procedencia de las muestras

Las muestras con valor de referencia pueden provenir de cuatro fuentes que se describen a continuación.

##### 4.2.1 Materiales de referencia certificados.

Existen en la actualidad materiales de referencia con valores numéricos de microorganismos.

Generalmente se presentan en cápsulas liofilizadas, por lo que será necesario añadirlas sobre matrices que no contengan el microorganismo objetivo.

Se pueden obtener por ejemplo de IRRM (Referencia bibliográfica).

Es necesario que sus certificados contengan una mínima información:

-Valor de referencia y especificación del microorganismo objetivo.

-Intervalo de confianza del valor ó requisitos incertidumbre (debe ser adecuada a los requisitos de validación).

-Métodos utilizados en la determinación del valor de referencia. (Deben ser compatibles con el método a validar).

-Número de laboratorios participantes.

-Sistema de uso y conservación.

Existen dificultades para conseguir MRC'S para algunos de los microorganismos, como ventaja cabe indicar que conserva su valor durante largos periodos de tiempo permitiendo pruebas de reproducibilidad.

##### 4.2.2 Muestra analizada con método alternativo

Requiere que el método alternativo esté validado, y que se tome su valor como referencia.

En general no se puede realizar una comparación en un largo periodo de tiempo a no ser que se comparen, pares de muestras distintas.

##### 4.2.3 Muestras procedentes de un ensayo de intercomparación

Se toma como valor de referencia el valor indicado por el organizador, pero requiere:

-Que se conozca la forma de estimación de dicho valor. Preferentemente media de los valores logarítmicos.

-Que la variabilidad sea conocida, y suficientemente pequeña.

-Que las muestras incluyan matriz y no solo liofilo.

-Que el número de participantes para obtener el valor medio sea suficiente, mayor de 30.

##### 4.2.4 Muestras dopadas con cantidades conocidas de suspensiones de cepas de referencia procedentes de colecciones de cultivo internacionales

En general los laboratorios disponen de este tipo de cepas, con objeto de controlar sus medios de cultivo y realizar operaciones de control de calidad.

Estas cepas se caracterizan por una tipificación clara del microorganismo objetivo con trazabilidad internacional, pero no disponen de un valor cuantitativo de recuento. Por ello es necesaria una operación previa ó simultánea de estandarización, consistente en el cultivo en general en un

medio no selectivo, y en condiciones de tiempo y temperatura definidas, de una alícuota de la suspensión con que se dopan las muestras para, calculada la concentración de dicha suspensión, y teniendo en cuenta el volumen dopado y la cantidad de muestra sobre la que se produjo el dopaje, disponer de un valor de referencia, con el que comparar el obtenido por la aplicación de nuestro método, sobre la muestra dopada.

## 5.- Problemas actuales en la validación

### 5.1 Definición de requisitos a los parámetros

En la actualidad no se dispone aun de suficiente información para definir valores aplicables como criterios, y no existen normativas al respecto, como han surgido en el campo de la química, donde algunas legislaciones nacionales ó europeas fijan criterios para exactitud ó precisión.

Por otro lado el número mínimo de pruebas a realizar para garantizar el cumplimiento de determinadas probabilidades (por ejemplo: Límite de Detección probabilidad del 95%), ya que no se estima mediante una desviación estándar, sino con un número de casos positivos ó negativos, puede resultar muy elevada.

$$N^{\circ} \text{ m\u00ednimo} = \frac{100}{100 - \text{Pr ob}} \quad (5)$$

Esto supone la necesidad de aceptar como válidas probabilidades no muy elevadas (por ejemplo 90%) que permiten la realización de un nº de repeticiones costosa (10), pero posible.

### 5.2 Rangos de validación – límite cuantificación

En los últimos tiempos se ha creado un debate sobre la necesidad ó no de realizar pruebas experimentales para obtener un límite de cuantificación.

En opinión del autor la necesidad de estimar experimentalmente un límite de cuantificación es dudosa ya que:

1) Debido a la suposición de las distribuciones que siguen los valores de ufc's de las muestras (Poisson ó binomial negativa) se espera que teóricamente este límite sea superior a 16 ufc's (CV = 25% para Poisson y superior para binomial).

2) Este hecho ya ha sido indicado por numerosas normas de análisis microbiológicos que indican que a partir de 15 a 25 ufc's los recuentos son aproximados.

3) Sin embargo la importancia de detectar una única ufc puede ser importante para valorar posibles riesgos patógenos.

Por ello la comunidad microbiológica ha aceptado expresar numéricamente, e informar de los resultados que proviniesen de la existencia de una sola ufc, aunque su reproducibilidad fuese dudosa.

4) Por ello, aún si se calculase el límite de cuantificación, debería poderse continuar dando valores inferiores al calculado, por lo que su determinación no tiene una utilidad excesiva en la expresión de resultados, como en otros campos (química).

5) La realización de las pruebas experimentales en la zona del límite de cuantificación conlleva la necesidad de establecer requisitos de aceptación muy amplios debido a la variabilidad de las medidas.

Por ello determinadas normas por ejemplo ISO TR 13843 aconsejan que las pruebas de exactitud y precisión se realicen en zonas de recuentos superiores (al menos 30 ufc de recuento), para asegurar que se pueden establecer criterios exigentes, e indican, que si se cumplen los criterios en zonas superiores, también se cumplirán en inferiores.

Todo ello indica que será necesaria una reflexión general para valorar la utilidad y necesidad de determinación del límite de cuantificación.

### 5.3 Tipos de muestras utilizadas

Otro de los debates existentes en la actualidad es la posibilidad de utilizar muestras estériles dopadas con microorganismos, ó muestras naturales dopadas.

Ambos sistemas tienen sus ventajas e inconvenientes.

#### 5.3.1 Muestras estériles

Garantizan la falta de microorganismo objetivo por el propio proceso.

Son el único sistema posible para algún tipo de análisis, por ejemplo aerobios, sino disponemos de método alternativo ó intercomparación.

Por el contrario los microorganismos acompañantes deben ser dopados, y probablemente no presentan una riqueza de flora natural como en el caso de muestras naturales.

#### 5.3.2 Muestras naturales

La garantía de no existencia del microorganismo objetivo se obtiene aplicando en muchos casos el método que se quiere validar, lo cual supone un riesgo.

En muchos casos es necesario un dopaje de microorganismos acompañantes, debido a que pueden no existir algunos interesantes para valorar las interferencias.

Tienen la ventaja de la existencia de flora natural por lo que son representativos de situaciones reales.

### 5.4 Obtención de valores de referencia

Uno de los sistemas de obtención de los valores de referencia, lo constituyen los valores procedentes de circuitos de intercomparación. Es imprescindible sin embargo que los organizadores de los mismos tengan en cuenta una serie de particularidades para que sus datos puedan ser aprovechados por los laboratorios.

a) Utilización de muestras reales con matriz para que los datos sean válidos.

b) Necesidad de microorganismos acompañantes.

c) Obtención de valores de referencia bien definidos (poca variabilidad) y descripción del método de determinación del valor de referencia.

d) Número de participantes suficiente.

Otro de los sistemas utilizados es la adición de volúmenes de una suspensión con una concentración de ufc's determinada, mediante el cultivo en unas condiciones de tiempo y temperatura de incubación determinados, usando un medio de cultivo no selectivo.

Es imprescindible establecer normas comunes que permitan "estandarizar" el contenido de las suspensiones, haciendo comparables los resultados de los diferentes laboratorios, y generando una referencia común que nos permita valorar las características de los métodos.

### **Bibliografía**

*Curso Validación y Cálculo de Incertidumbre en ensayos microbiológicos.* J. Laso. Gabinete de Servicios para la Calidad (GSC).

Cochran W.G. *Estimation of bacterial densities by means of the "Most probable Number"*. Biometrics 6, 1950 App 39-52.

ISO TR 13843 *Water quality – Guidance on validation of microbiological methods.*

ISO/DIS 17994 *Water quality. Criteria for establishing de equivalency of two microbiological methods.*

ISO 16140 *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods.*

Institute for reference materials and measurements