

AENOR LABORATORIO

Los microorganismos presentan una gran capacidad para sufrir variaciones genéticas y mutaciones, por lo que es necesario realizar una correcta validación de los métodos de análisis alternativos existentes en la microbiología de los alimentos para verificar que sus resultados son comparables con los que se obtienen empleando métodos de referencia. AENOR Laboratorio ofrece a fabricantes y distribuidores de estos métodos alternativos un proceso de validación y certificación que los equipare con los de referencia.



Validación de métodos alternativos

Pablo de Vicente
Adjunto al Director
AENOR
Laboratorio

En el último tercio del siglo XIX, el bacteriólogo alemán Robert Koch y su equipo buscaban desarrollar métodos sencillos para obtener cultivos puros de microorganismos. Fue una rodaja de patata el primer sustrato sólido nutritivo que utilizó Koch, sobre el que observó que se podían desarrollar colonias macroscópicas de bacterias que presentaban una morfología característica. Al mismo tiempo, dos de sus colaboradores proporcionaron avances importantes en este campo: Walter Hesse, médico alemán, introdujo el uso del agar-agar en los medios de cultivo, atendiendo una sugerencia de su esposa, Angelina Fannie; y Julius Richard Petri, también médico, sustituyó las engorrosas bandejas de vidrio cubiertas con campanas por un sistema más sencillo de placas de cristal planas. Estas placas han evolucionado a lo que hoy en día se conoce como placas de Petri.

A partir de entonces, la microbiología avanzó de forma considerable, siendo uno de los objetivos la normalización de los métodos de análisis. Diferentes organizaciones, como ISO o la plataforma del sector lácteo internacional (FIL), han dedicado y dedican innumerables esfuerzos al desarrollo de métodos

normalizados. Estos métodos, llamados de referencia, están reconocidos internacionalmente y han sido sometidos a validaciones muy completas previas a su publicación y aceptación.

Pero los adelantos en el campo de la microbiología no se han detenido. En los últimos años se han producido numerosos avances en los campos de la biotecnología, la automatización y la microelectrónica que han conllevado el desarrollo de un gran número de métodos alternativos de análisis, proponiendo enfoques diferentes para la detección y cuantificación de microorganismos en alimentos. Estos métodos son rápidos, sencillos de realizar y generalmente más económicos que los métodos de referencia; pero, ¿están reconocidos estos métodos de análisis alternativos?

Tanto la Administración como las entidades de acreditación reconocen estos métodos alternativos siempre y cuando se encuentren validados. El Reglamento 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios establece en el artículo 5: *Se autorizará el uso de métodos analíticos alternativos cuando los métodos estén validados con respecto al*

método de referencia establecido en el anexo I y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN-ISO 16140 u otros protocolos similares internacionalmente aceptados. Asimismo, la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), en su NT 32 sobre análisis microbiológicos define como método alternativo: Métodos que han sido validados por comparación con el método de referencia que corresponda, de acuerdo a un estándar aceptado (ej. ISO 16140, ISO/TR 13843, ISO 17994, etc.) y son generalmente reconocidos por la comunidad científica y tecnológica como equivalentes al método de referencia.

Los microorganismos presentan una gran capacidad para sufrir



variaciones genéticas y mutaciones. Esta característica, inherente a los microorganismos, hace necesario realizar una correcta validación de los métodos de análisis alternativos existentes en la microbiología de los alimentos con el objeto de verificar que los resultados obtenidos son comparables con los que se obtienen empleando el método de referencia. Por tanto, los fabricantes y distribuidores de estos métodos alternativos necesitan solicitar y poner en marcha el proceso de validación y certificación que los equipare con los métodos de referencia.

Proceso de validación y certificación

En el proceso de validación y certificación de métodos alternativos participan dos entidades, que trabajan de forma coordinada: la entidad de certificación encargada de verificar el proceso de validación, realizar las auditorías y conceder el certificado; y el laboratorio organizador que lleva a cabo el estudio comparativo e interlaboratorio. Ambos participan en las cuatro etapas en las que se divide el proceso:

1. Diseño del procedimiento: es función del laboratorio organizador diseñar el procedimiento de validación del método.

2. Estudio comparativo: el laboratorio organizador compara el método alternativo frente al método de referencia en esta etapa.

3. Estudio interlaboratorio: varios laboratorios analizan las mismas muestras empleando el método alternativo y de referencia.

4. Auditoría del proceso de fabricación: la entidad de certificación audita el proceso de producción para verificar el aseguramiento de la calidad y los controles en la producción. ►►



AENOR LABORATORIO

► Diseño del procedimiento

Esta etapa, previa al proceso de validación, condiciona en gran medida el resultado de la misma. El laboratorio organizador, tras estudiar la información aportada por el fabricante o distribuidor del método alternativo, tiene que definir, entre otros, el método de referencia, las categorías de alimentos en las que se realizarán los análisis y las cepas con las que se van a llevar a cabo los diferentes estudios. Previamente al comienzo de los estudios de validación, el diseño del procedimiento debe ser validado por la entidad de certificación.

Estudio comparativo

Esta fase consiste en la realización de un estudio comparativo de los dos métodos, referencia y alternativo, enfrentando los resultados obtenidos en el análisis de las muestras mediante ambos métodos. En el estudio comparativo se someten a ensayo un gran número de muestras, de diferentes categorías de alimentos y con diferentes niveles de contaminación, tanto por el método de referencia como por el método alternativo.

El laboratorio organizador realiza los ensayos necesarios empleando, preferentemente, muestras naturalmente contaminadas. En el caso de que no fuera posible, se utilizan muestras contaminadas artificialmente con cepas a las que se ha sometido a un estrés previo.

Las pruebas y estudios en esta etapa varían de acuerdo con el tipo de método que hay que validar: cualitativo o cuantitativo. En los métodos cualitativos el estudio comparativo se centra en la determinación de los valores de eficacia relativa, especificidad relativa, sensibilidad

relativa, nivel de detección relativa, inclusividad y exclusividad. En el caso de los métodos cuantitativos, los parámetros que hay que estudiar son la linealidad, exactitud, límites de detección y cuantificación, sensibilidad relativa, especificidad y selectividad.

Estudio interlaboratorio

Los objetivos principales de este estudio son determinar la variabilidad de los resultados obtenidos por diferentes laboratorios cuando analizan muestras idénticas y comparar estos resultados con los obtenidos en el estudio comparativo de los métodos. También permite determinar las características de funcionamiento comparativo de un método alternativo respecto al método de referencia. El laboratorio organizador es el responsable de la puesta en marcha del ejercicio interlaboratorio, teniendo en cuenta las directrices indicadas en el Anexo H de la Norma UNE-EN ISO 16140:2003/A1 *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Protocolo de validación de métodos alternativos. Modificación 1*

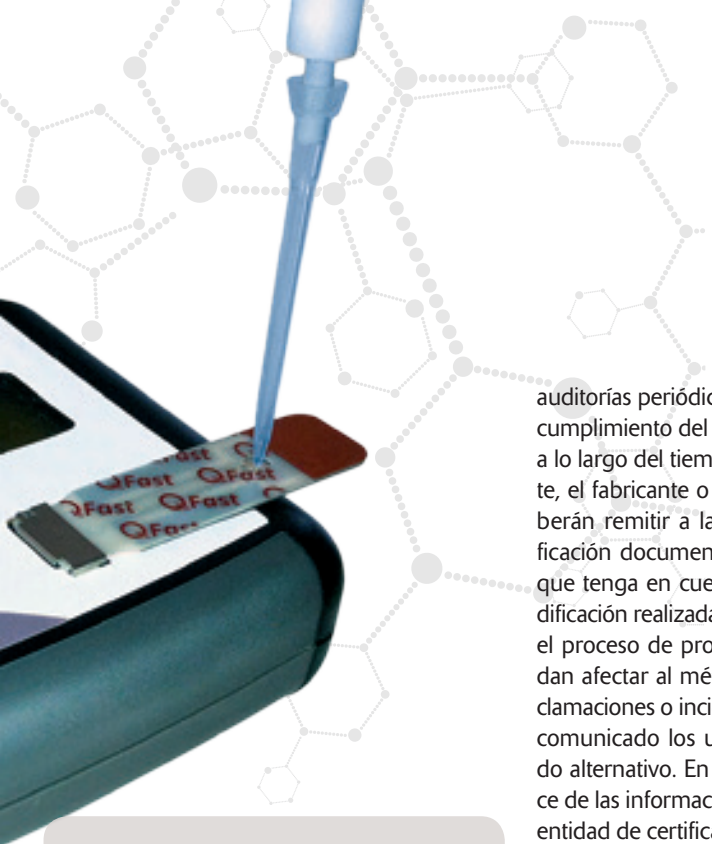
El Reglamento 2073/2005 establece la autorización de métodos alternativos si, por ejemplo, están certificados según la Norma EN-ISO 16140



para la organización y ejecución de los estudios colaborativos.

Para la realización del estudio se emplea un producto alimenticio de una de las categorías de alimentos validadas. De forma general, las muestras se contaminaran artificialmente, asegurándose previamente de la ausencia del analito diana en la muestra. Tanto la muestra como el inóculo con el microorganismo diana deben ser homogéneos y permanecer estables durante el proceso de transporte y la duración de los análisis.

Los laboratorios participantes en el ejercicio, y en particular los técnicos que realicen los ensayos, deben tener experiencia suficiente en la realización de los análisis mediante el método de referencia. Previamente al inicio del ejercicio es imprescindible realizar una correcta formación en el método alternativo, permitiendo que los laboratorios se familiaricen con el procedimiento de ensayo y con los equipos que deberán emplear posteriormente en el ejercicio. Es necesario que al menos 10 laboratorios



auditorías periódicas para verificar el cumplimiento del sistema de calidad a lo largo del tiempo. Adicionalmente, el fabricante o el distribuidor deberán remitir a la entidad de certificación documentación actualizada que tenga en cuenta cualquier modificación realizada en el equipo o en el proceso de producción que puedan afectar al método, así como reclamaciones o incidencias que hayan comunicado los usuarios del método alternativo. En función del alcance de las informaciones aportadas, la entidad de certificación decidirá si es necesario realizar estudios analíticos adicionales para renovar o mantener el certificado.

Sólo en España encontramos más de 1.000 laboratorios de alimentos y aguas homologados por la Administración o acreditados por ENAC que necesitan que los métodos que emplean se encuentren reconocidos. Pero no son los únicos; son muchos más los laboratorios que, a pesar de no contar con estos reconocimientos, exigen a sus proveedores la certificación de los métodos. La certificación de métodos analíticos alternativos permite abrir a los fabricantes y distribuidores un gran mercado en el ámbito nacional e internacional, tanto de industrias como de laboratorios que precisan realizar análisis dentro de un marco regulado, bien por la Administración o por las exigencias de las entidades de acreditación.

AENOR, dentro de su política de ayuda a la mejora de la calidad de las empresas, de sus productos y servicios, actúa como entidad de certificación y laboratorio organizador, dando un servicio global a los fabricantes y distribuidores de métodos alternativos. AENOR es la primera entidad en España que ofrece este servicio de certificación y validación, y acaba de conceder el primer certificado a un método analítico emitido por una entidad española: Imicroq. ▀

CURSOS DE AENOR RELACIONADOS



• Microbiología alimentaria para no microbiólogos

(ocho en el caso de métodos cuantitativos) reporten resultados no discrepantes.

Auditoría del proceso de fabricación

Tras el proceso de validación del método, es necesario verificar, mediante una auditoría, que el fabricante del método alternativo tiene implantado un Sistema de Gestión de la Calidad, por ejemplo de acuerdo con la Norma UNE-EN ISO 9001, cuyo alcance incluya la línea de producción del método alternativo. El sistema implantado debe cubrir los requisitos de aseguramiento de la calidad, así como los de control de la producción del producto.

El organismo de certificación es el encargado de realizar y valorar las auditorías, así como de valorar los datos obtenidos en el estudio comparativo e interlaboratorio y tomar la decisión de la concesión o no del certificado.

Una vez concedido el certificado, el organismo de certificación realizará



EXPERIENCIAS

Pioneros en certificación

Pablo Lozano

Responsable de I+D
iMICROQ
(España)

La Salmonelosis es una enfermedad que afecta a los humanos y es producida por una enterobacteria del género *Salmonella*. Dentro de los ámbitos de mayor necesidad de control de este microorganismo destaca su incidencia en la industria avícola y alimentaria, cuyo análisis se encuentra regulado en el ámbito europeo y es objeto de Programas Nacionales de Control. iMICROQ es una empresa de base tecnológica creada en el 2010 con el objeto de explotar comercialmente la plataforma QFast® para la detección de patógenos de manera rápida, sencilla y con un bajo coste. Y su primera línea de productos (QFast® *Salmonella spp*) permite la detección de *Salmonella spp* en menos de 24 horas de tiempo real.

Desde su origen, siempre apostó por la necesidad de ofrecer la máxima calidad en sus productos y la máxima fiabilidad en sus resultados. Actualmente, la mejor manera de asegurar ambos criterios es poder proveer productos certificados de acuerdo con las normas ISO y la legislación vigente.

AENOR Laboratorio es una entidad de acreditada reputación con la capacidad certificar de manera independiente métodos alternativos de detección de patógenos de acuerdo con la Norma ISO 16140. El kit QFast® *Salmonella* ha obtenido recientemente esta certificación como método alternativo al método oficial para la detección de *Salmonella spp* en muestras veterinarias, ambientales (incluida producción primaria: heces o polvo) y de alimentación animal. Este kit producido por iMICROQ y certificado por AENOR Laboratorio constituye un hito al ser el primer producto producido y certificado íntegramente en España que logra una validación internacional.

El prestigio de AENOR como entidad certificadora ha constituido un apoyo adicional para una empresa joven como iMICROQ, con marcado carácter innovador, cuya intención ha sido certificar un producto de calidad cuya implantación en el mercado se pueda realizar a todos los niveles. El respaldo de la certificación sitúa al kit QFast® *Salmonella spp* al nivel de los mejores instrumentos de detección de patógenos que existen en el mercado internacional.