

ARTICULO DE INVESTIGACION

**PROCEDIMIENTO PARA LA VERIFICACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS
CUALITATIVOS DE REFERENCIA DE LA CADENA ALIMENTARIA**

**PROCEDURE FOR THE VERIFICATION OF QUALITATIVE MICROBIOLOGICAL
REFERENCE METHODS OF THE FOOD CHAIN**

Tamara K. Martino Zagovalov* (0009-0000-2171-1942)
Virginia Leyva Castillo* (0000-0002-3332-6475)
Marianela Ramón Corría* (0000-0002-3846-3436)
Yamila Puig Peña* (0000-0003-2404-123X)
Yaumara Ferrer Márquez* (0000-0001-9197-7877)

*Instituto Nacional de Higiene Epidemiología y Microbiología (INHEM). Infanta 1158 e/Llinás y Clavel, La Habana, Cuba.

*tamarakelymartino@gmail.com

Recibido: 08 de noviembre de 2023;

Aceptado: 04 de diciembre de 2023;

RESUMEN

Los laboratorios de ensayo para insertarse en mercados competitivo deben tener un sistema de gestión de calidad y estar preferentemente acreditados; entre los requisitos de la norma NC ISO/IEC 17025 está la verificación de los métodos. presentar una metodología para dar cumplimiento a los requisitos de calidad relacionados con la verificación de métodos de referencia microbiológicos cualitativos estandarizados. Se realizó una revisión documental y un análisis del sistema de gestión de la calidad del laboratorio con la aplicación de una lista de chequeo. Se estableció la estructura de la documentación y se elaboró un procedimiento, en correspondencia con el alcance de aplicación de los requisitos técnicos estipulados en la norma ISO 16140-3: 2021, la implementación de la documentación se aplicó en la verificación del método ISO 6579-1 para detección para *Salmonella* spp. Se identificaron dos requisitos a incorporar en la documentación, correspondientes con la identificación del personal autorizado a realizar verificaciones, y con la elaboración de los documentos técnicos según la norma ISO 16140-3. Se elaboró un procedimiento "Verificación de métodos microbiológicos cualitativos de referencia aplicados en la Sección Microbiología Sanitaria", que explica en ocho pasos las actividades de verificación para métodos validados y no (totalmente) validados. En la implementación de la documentación los protocolos de verificación para el método ISO 6579-1 se llevaron a cabo correctamente, los valores de la característica de desempeño estimada en cada alimento seleccionado cumplieron los límites de aceptabilidad. La metodología aplicada demostró la comprensión del procedimiento técnico en el laboratorio. Los documentos elaborados dieron respuesta a las exigencias de la norma NC ISO/IEC 17025: 2017. Los resultados permiten demostrar la competencia del laboratorio, importante contribución en los análisis relacionados con la inocuidad de los alimentos.

Palabras clave: microbiología, alimentos, gestión de la calidad; verificación de métodos de referencia.

ABSTRACT

A competitive market requires the testing laboratories should be provided, to quality management system and preferably be accredited; verification of methods is one of the requirements demanded by NC ISO/IEC 17025 standard. Present a methodology to comply with the quality requirements related to the verification of qualitative microbiological reference method described in a standard. A documentary review and analysis of the laboratory's quality management system was carried out with the application of a checklist. The documentation structure was established and a procedure was developed, in accordance with the application scope of the technical requirements in the ISO 16140-3:2021 standard, the verification procedure was implemented to the ISO 6579-1 method for detection of *Salmonella* spp. In the checklist, it was identified two new requirements, related to the personnel authorized to carry out verifications and the preparation of technical documents according to the ISO 16140-3 standard. The procedure relative to verification activities for validated and not (fully) validated reference methods "Verification of qualitative microbiological reference methods applied in the Health Microbiology Section" was explained in eight steps. The verification protocols of the ISO 6579-1 method were correctly carried out in the implementation of the documentation; in each selected food, the values of the estimated performance characteristic did not exceed the acceptability limits. The methodology applied demonstrated the greater ease of application technical procedure in the laboratory. The modified quality documentation allowed compliance with the NC ISO/IEC 17025 standard. The results demonstrate the laboratory's competence, an important contribution to analyze related to food safety.

Keywords: microbiology, foods, quality management; verification of reference methods.

INTRODUCCION

Los laboratorios de ensayo para insertarse en un mercado competitivo deben contar con un sistema de gestión de la calidad implementado y deben estar de preferencia acreditados. La norma NC ISO/IEC 17025, la cual es la más usada como guía para este fin, tiene como exigencia en el capítulo de requisitos del proceso, la validación y verificación de los métodos.¹⁻³

Este ha sido un punto álgido para los laboratorios de ensayo en el campo de la microbiología de la cadena alimentaria ya que, no existía una metodología establecida para la verificación de los métodos microbiológicos de referencia, la decisión cómo proceder para este fin se determinaba de acuerdo con la experiencia de los analistas y los recursos disponibles; así como, las necesidades de los laboratorios para realizar estas comprobaciones.²

Recientemente se ha publicado la parte tres de las normas ISO 16140 que, ha ofrecido la solución técnica para llevar a cabo las verificaciones de métodos por un laboratorio; la normativa aplica a los métodos descritos en estándares elaborados por organizaciones internacionales como, la Organización Internacional de Normalización (ISO) y el Comité Europeo de Normalización (CEN); así como, las adopciones idénticas de estos documentos por los países, entre otros.⁴

Cuando estos estándares se emplean en los análisis rutinarios, la aplicación de la norma ISO 16140-3 en la verificación de los métodos, es suficiente para satisfacer los requerimientos de NC ISO/IEC 17025. De ahí que, para la correcta implementación de estas normativas, cada laboratorio debe elaborar la documentación requerida en función de la estructura de su sistema de gestión de la calidad.³

En este contexto, se elaboró este trabajo con el objetivo de presentar una metodología para dar cumplimiento a los requisitos de calidad y técnicos relacionados con la verificación de métodos de referencia microbiológicos cualitativos estandarizados, de acuerdo con las normas NC ISO/IEC 17025 e ISO 16140-3.^{3,4}

METODOLOGÍA

El trabajo se desarrolló en la Sección de Microbiología Sanitaria perteneciente al Departamento de Laboratorios, del Instituto Nacional de Higiene Epidemiología y Microbiología (INHEM), en el periodo 2021-2022. En tres etapas:

Etapas 1: Competencia del laboratorio. Se realizó un análisis documental de las normas NC ISO/IEC 17025:2017 e ISO 16140-3:2021. Se utilizó como herramienta una lista de chequeo, para determinar la conformidad en relación con los requisitos relacionados con la verificación de los métodos por la norma NC ISO/IEC 17025; se identificaron, además, las acciones a acometer para la actualización de la documentación del sistema de gestión de la calidad.^{3,4}

Etapas 2: Documentación. Se estableció la estructura de la documentación correspondiente a la verificación de métodos de ensayo y se elaboró un procedimiento, en correspondencia con el alcance de aplicación en el laboratorio, de acuerdo a los requisitos técnicos estipulados en la norma ISO 16140-3.⁴

Etapas 3: Implementación del procedimiento. El procedimiento elaborado se aplicó en la verificación del método ISO 6579-1 para detección para *Salmonella* spp., en alimentos correspondientes a las categorías dentro del alcance de la validación del método y en alimentos de una categoría dentro del alcance de aplicación del laboratorio, no incluidos en el estudio de validación.^{4,6} Además, se tuvo en cuenta que, el parámetro estuviera en correspondencia con los grupos de alimentos de la norma NC 585.⁷

Los datos sobre las características del alimento, análisis de microorganismos indicadores de la calidad sanitaria y de patógenos se obtuvieron del registro DSC.MS.03.29 “Libro de Seguimiento (salida de resultados) y de las fichas técnicas de alimentos, del Departamento de Calidad y Registro Sanitario del Ministerio de Salud Pública. El criterio de aceptación de los alimentos verificados se comprobó en DSC.MS.03.57 “Registro de verificación de métodos”.

RESULTADOS

Competencia del laboratorio

En el análisis de la norma NC ISO/IEC 17025 se identificaron dos requisitos necesarios de modificar en la documentación del sistema de gestión de la calidad, uno de ellos implicó la identificación del personal autorizado a realizar verificaciones, y el otro, la elaboración de los documentos técnicos según la norma ISO 16140-3. Los cambios realizados se presentan en el cuadro a continuación.

Cuadro 1. Requisitos modificados en la documentación del sistema de gestión de la calidad. INHEM, 2021.

Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración NC-ISO/IEC 17025:2017		Modificaciones en la documentación
6. Requisitos relativos a los recursos	6.2. Personal. 6.2.6 El laboratorio debe autorizar al personal para llevar a cabo actividades del laboratorio específicas, incluidas, pero no limitadas a las siguientes: a) desarrollar, modificar, verificar y validar métodos.	Se incluyó en el documento: Registro de autorizaciones al personal (DSC.MS.03.47.6), el personal técnico facultado para verificar los métodos de ensayo.
7. Requisitos del proceso	7.2.1. Selección y verificación de métodos. 7.2.1.5. El laboratorio debe verificar que puede llevar a cabo apropiadamente los métodos antes de utilizarlos, asegurando que se pueda lograr el desempeño requerido. Se deben conservar registros de la verificación.	Se elaboró un procedimiento (DSC.MS.02.39) para la verificación de los métodos de referencia cualitativos. Se implementó el registro técnico (DSC.MS.03.57), que recoge toda la información para demostrar a los clientes, a los auditores internos y al órgano de acreditación, el proceso de verificación.

Leyenda: DSC.MS: Documento del Sistema de Gestión de la Calidad de Microbiología Sanitaria (03. corresponde a registro técnico 47.6: Registro del personal: autorizaciones, 57: Registro de verificación de métodos), (02. corresponde a procedimiento 39: Verificación de métodos microbiológicos cualitativos de referencia aplicados en la Sección Microbiología Sanitaria).

Documentación

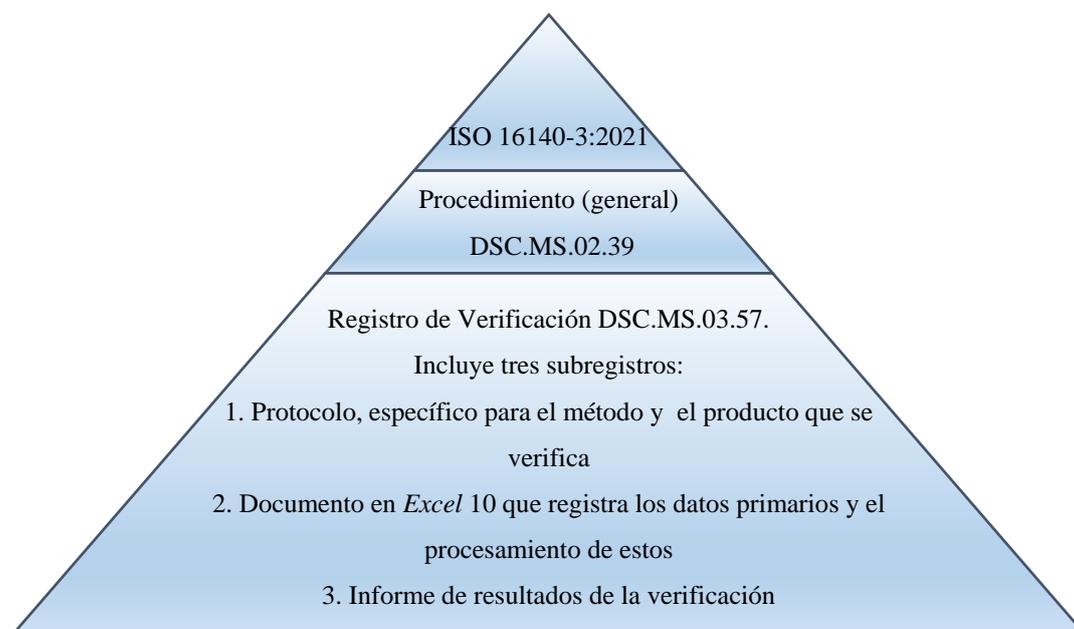
Estructura de la documentación

La estructura de la documentación quedó conformada de acuerdo al esquema de la figura 1. La documentación elaborada incluyó:

- un procedimiento DSC.MS.02.39 “Verificación de métodos microbiológicos cualitativos de referencia aplicados en la Sección Microbiología Sanitaria”, en el que se describieron líneas generales de la norma ISO 16140-3.

El documento se concibió como un referente o guía para elaborar el protocolo específico de acuerdo al método y producto(s) a verificar.

Figura 1. Estructura de la documentación para la verificación de método. INHEM, 2021-2022.



Leyenda: DSC.MS: Documento del Sistema de Gestión de la Calidad Microbiología Sanitaria (03. corresponde a registro técnico 47.6: Registro del personal: autorizaciones, 57: Registro de verificación de métodos), (02. corresponde a procedimiento 39: Verificación de métodos microbiológicos cualitativos de referencia aplicados en la Sección Microbiología Sanitaria).

- un registro DSC.MS.03.57 “Verificación de métodos”, que unificó toda la documentación generada para cada método en particular, el cual se conformó por tres subregistros, estos fueron:
 - protocolos de verificación con el proceder para la determinación del límite de detección estimado para el 50% de probabilidad de detección (eLOD₅₀), para uno o varios productos de las categorías de interés.
 - documento con los datos primarios, cálculos, comparación con criterios de aceptabilidad y su cumplimiento, elaborado en el programa Microsoft *Excel* 2010. Se elaboró un *libro de Excel* por método analítico, en el cual cada *hoja de cálculo* corresponde a un producto verificado.
 - informes de verificación, con toda la información necesaria para la interpretación de los resultados; incluyendo una declaración de la validez del método.

Procedimiento técnico

El flujo de trabajo para desarrollar el procedimiento de verificación se presenta en la Figura 2. Las pautas técnicas y de calidad consideradas en el procedimiento, se describen a continuación:

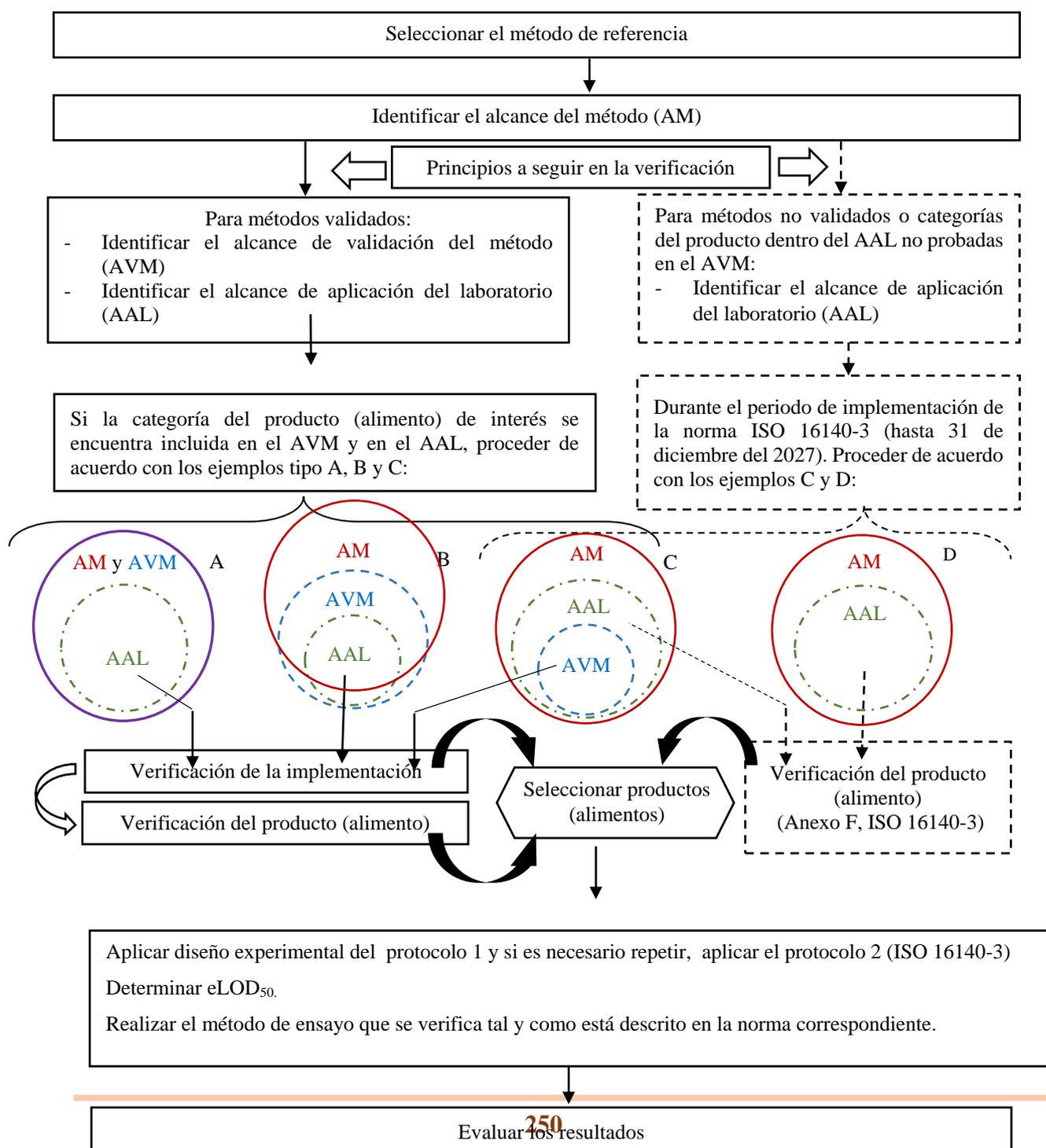


Fig. 2. Diagrama del procedimiento para la verificación de métodos cualitativos de referencia. INHEM, 2021-2022.

Leyenda: AM: alcance del método, AVM: alcance de la validación del método, AAL: alcance de aplicación del laboratorio, ISO: Organización Internacional de Normalización, eLOD₅₀: límite de detección estimado para el 50% de probabilidad de detección.

1. **Selección del método**, se debe tener en cuenta la condición que, fuera un método microbiológico cualitativo de referencia de la cadena alimentaria, adecuado para el producto, que estuviera declarado en los documentos del sistema de gestión de la calidad (de acuerdo con el acápite 7.2.1.1 de NC ISO/IEC 17025); se consideró la disponibilidad de los recursos y el cumplimiento de la política de trazabilidad del Organo Nacional de Acreditación de la República de Cuba (ONARC) para realizar la verificación en la extensión necesaria de acuerdo al AAL.
2. **Identificación del alcance del método (AM)**, se determinó a partir del conjunto de productos para los cuales el método (a verificar) informa que es aplicable. El AM puede incluir productos de 18 categorías, las cuales se describen en el Anexo A de la norma ISO 16140-3; abarcan, alimentos para consumo humano (15 categorías), alimentos para animales (1 categoría), muestras ambientales en el área de la producción y manipulación de los alimentos (1 categoría), y muestras de la producción primaria (1 categoría).
3. **Identificación del alcance de la validación del método (AVM)**, El AVM se determinó teniendo en cuenta los datos de validación publicados en el propio documento normativo. Se dividió en función de la cantidad de categorías a las que corresponden los productos probados en la validación, según los criterios siguientes:
 - “*de gama amplia de alimentos*”, cuando la validación incluyó productos de al menos cinco categorías diferentes de alimentos de consumo humano. Se considera que abarca las 15 categorías de alimentos involucradas. Según se observa en la figura 2, esta condición puede corresponder al caso A y si el AVM cumple esta condición, con el B.
 - “*de gama limitada de alimentos*”, cuando la validación abarcó menos de cinco categorías diferentes de alimentos de consumo humano. Según se observa en la figura 2, esta condición corresponde con el caso B y si el AVM cumple esta condición, con el C.
 - “*otras categorías*”, cuando la validación abarcó alguna de las tres categorías restantes (ver Identificación del alcance del método, explicado anteriormente).
 - combinación de las dos primeras clasificaciones “*gama amplia o limitada*” con la tercera “*otras categorías*”. Ejemplo: “*gama amplia*” + “*otras categorías*”, se validaron productos de 5 categorías de consumo humano y productos de las otras tres categorías restantes; se equiparan el AM y el AVM, corresponde al caso A de la figura 2.
4. **Identificación del alcance de aplicación del laboratorio (AAL)**, se estableció en función de la cantidad de categorías, a las que corresponden los productos que se desean verificar, para las que el laboratorio utiliza el método (se aplica igual denominación que en Identificación del alcance de la validación del método, descrito antes). Se relacionaron las categorías de interés en cada método a verificar con las determinaciones establecidas para cada grupo de alimentos en la norma cubana de criterios microbiológicos NC 585.
5. **Determinación del tipo de verificación a realizar**, el procedimiento explicó los dos protocolos descritos en la norma ISO 16140-3. Estos se identificaron en función del principio más general bajo el cual se realiza la verificación con la denominación siguiente:
 - a. **verificación bajo el AVM**, se realiza la verificación de la implementación y posteriormente, la del producto. Aplica cuando las categorías de los productos analizados rutinariamente en el laboratorio, aparecen en el estudio de validación del método.
 - b. **verificación bajo el AAL**, se realiza sólo la verificación del producto (de acuerdo con Anexo F de la norma ISO 16140-3). Aplica cuando los productos dentro del AAL y dentro del AM, no se encuentran dentro de las categorías de los productos probados en la validación. Según el esquema de la figura 2, este tipo de verificación se realizaría a los productos fuera del AVM en el caso C y a todos los del caso D, dentro del AAL.
6. **Selección de los productos a verificar**, se prosiguió en correspondencia con los incisos a y b anteriormente explicados y teniendo en cuenta las características desafiantes de los productos descritas en el Anexo B de la norma ISO 16140-3:
 - a. Los aspectos considerados en la selección fueron:
 - para la verificación de la implementación, escoger un producto (alimento) dentro del AVM y del AAL, y un tamaño de muestra igual al usado en la validación.
 - para la verificación del producto, escoger un alimento desafiante por cada categoría incluida en el AVM, representativo de aquellas categorías que se analizan en el laboratorio. Se debe usar el tamaño de la muestra establecido en el método, aunque puede ser menor si el laboratorio lo utiliza

rutinariamente. Cuando se cumple que el AVM y el AAL son de “*amplia gama*”, se selecciona un producto (alimento) incluido en la validación y al menos otros cuatro de igual número de categorías dentro del AAL no incluidas en la validación. Se deben tener en cuenta las “*otras categorías*” (alimentos para animales, muestras de ambiente, y de la producción primaria), si se encuentran dentro del AAL y del AVM.

- b. la selección del producto (alimento) se condiciona a las características desafiantes. Se realiza primero la verificación con un producto no desafiante y continúa con uno desafiante por cada categoría de interés del laboratorio.

El cuadro 2 indica la cantidad de productos que se requiere de acuerdo al principio bajo el cual se lleve a cabo la verificación.

Cuadro 2. Resumen del número mínimo de productos (alimentos) para la verificación de métodos de referencia.

AVM o AM	Verificación bajo el AVM		Verificación bajo el AAL	
	Verificación de la implementación	Verificación del producto	Verificación del producto	Verificación del producto
Alcance de “ <i>amplia gama de alimentos</i> ” ≥5 categorías de alimentos	1	≥5	1 alimento no desafiante + ≥5 N _{alimentos} desafiantes	no
Alcance de “ <i>gama limitada de alimentos</i> ” (Categorías de N _{alimentos})	1	N _{alimentos} ≤4	1 alimento no desafiante + ≤4 N _{alimentos} desafiantes	no
Alcance de “ <i>amplia gama de alimentos</i> ” + otras categorías (N _{otras})	1	≥5 productos + 1 producto de cada una de las otras categorías (N _{otras})	1 alimento no desafiante + ≥5 N _{alimentos} desafiantes + 1 producto desafiante de cada una de las otras categorías (N _{otras})	no
Alcance de “ <i>gama limitada de alimentos y otras categorías</i> ” (Categorías N _{alimentos}) + otras categorías (N _{otras})	1	N _{alimentos} ≤4 + 1 producto de cada una de las otras categorías (N _{otras})	1 alimento no desafiante + ≤4 N _{alimentos} desafiantes + 1 producto desafiante de cada una de las otras categorías (N _{otras})	no
Alcance para otras categorías (N _{otras}) solamente	1	N _{otras} ≤3	1 producto no desafiante (alimento u otro) + ≤3 N _{otras} desafiantes	no

Fuente de datos: ISO 16140-3:2021⁴

Leyenda: AM: alcance del método, AVM: alcance de la validación del método, AAL: alcance de aplicación del laboratorio, N: número de (alimentos u otras categorías, según corresponda).

7. **Estimación del LOD₅₀ (eLOD₅₀)**, esta característica de desempeño se determina en la verificación de la implementación y en la verificación de los productos (alimentos). La norma contiene tres protocolos que siguen diseños experimentales diferentes, en el laboratorio se seleccionaron los diseños experimentales de los protocolos 1 y 2. En el procedimiento se indicó la inoculación del producto a verificar con un cultivo de un microorganismo que esté dentro de los parámetros establecidos para este, proveniente de una cepa de referencia del banco de microorganismos del laboratorio; se recomendó el uso de diferentes géneros, especies o serotipos de microorganismos según corresponda con la clasificación taxonómica del microorganismo o grupo de microorganismos, en dependencia del método y los distintos productos que se prueben. Los pasos a seguir se describen a continuación:
- Realizar el conteo del microorganismo objeto de estudio, a partir de un cultivo de 24 horas en un medio no selectivo en condiciones que permitan un crecimiento óptimo de la cepa. El resultado se utilizó como punto de partida para realizar las diluciones a inocular en las porciones de ensayo. El cultivo usado en

la verificación, se obtuvo bajo las mismas condiciones antes explicadas; los cultivos estables se pueden conservar a 4 °C por 24 horas.

- Se indicó aplicar el protocolo 1 y cuando los resultados no son satisfactorios, se repite el ensayo utilizando el diseño del protocolo 2. Como se aprecia en el cuadro 3, la cantidad de porciones de ensayo a preparar depende del diseño que se lleve a cabo, una de las porciones de ensayo (control blanco) no se contamina.

Cuadro 3. Número mínimo de repeticiones por nivel de inoculación.

Protocolo	Nivel de inoculación de la porción de ensayo				Número total de réplicas
	Nivel alto 9xLOD ₅₀ /porción de ensayo	Nivel intermedio 3xLOD ₅₀ /porción de ensayo	Nivel bajo 1xLOD ₅₀ /porción de ensayo	Blanco	
1	1	4	4	1	10
2	-	3	5	1	9

Fuente: ISO 16140-3:2021. ⁴

Leyenda: LOD₅₀: límite de detección para el 50% de probabilidad de detección.

- Cuando se aplica la verificación bajo el AVM, se define el intervalo de contaminación a utilizar en las porciones de ensayo tomando como referente el valor de LOD₅₀ del estudio de validación. Cuando la verificación se realiza bajo AAL, se asume que el valor del LOD₅₀ es menor o igual a 1 unidad formadora de colonia en la porción de ensayo (UFC/porción de ensayo).
- Se seleccionan las diluciones correspondientes para tres niveles de contaminación a partir del conteo preliminar, y se inocula la suspensión inicial del producto para cada nivel. Los niveles de inoculación de acuerdo al diseño experimental se obtienen de la siguiente forma:
 - Protocolo 1: Nivel alto: hasta un máximo de nueve veces el LOD₅₀ esperado; Nivel intermedio: se obtiene a partir de una dilución 1:3 del nivel alto; Nivel bajo: a partir de una dilución 1:3 del nivel intermedio.
 - Protocolo 2: Nivel intermedio: un máximo de hasta tres veces el LOD₅₀ esperado; Nivel bajo: se obtiene a partir de una dilución 1:3 del nivel intermedio.

Se pueden inocular más diluciones para asegurar la inclusión de los niveles previstos en la verificación, con el empleo de un factor de dilución 1:3 entre los niveles.

- Para determinar el nivel de inóculo se realiza un conteo en placas en un medio no selectivo del nivel obtenido con la mayor contaminación de acuerdo al protocolo usado (ver cuadro 2); alternativamente se puede usar una determinación por número más probable (NMP) en un medio no selectivo. En paralelo se inoculan las porciones de ensayo. Los niveles de contaminación de los otros inóculos se calculan utilizando los conteos obtenidos para el inóculo del nivel alto o del intermedio, según corresponda, y teniendo en cuenta el factor de dilución utilizado.
- El ensayo se realiza tal y como se describe en el método que se verifica, se aplica a cada porción de ensayo. La confirmación de una colonia es suficiente.
- Para determinar el eLOD₅₀ cuando se usa el protocolo 1: se anota el número de resultados positivos; para evaluar los datos, se seleccionan las tres diluciones con el nivel de inoculación bajo más cercano al LOD₅₀ esperado; se multiplica el resultado del nivel más bajo de contaminación por el valor que ofrece cada combinación de resultados positivos en la tabla 6 de la norma ISO 16140-3. Los cálculos realizados se consideran válidos cuando el control blanco ofrece un resultado negativo, el nivel alto es positivo y no se obtiene ningún resultado “no confiable” en las combinaciones del NMP.
- Cuando es necesario repetir el experimento con el protocolo 2, se utiliza la tabla 8 de la norma ISO 16140-3.

8. **Evaluación de los resultados:** Se determina si el eLOD₅₀ cumple el criterio de aceptación de acuerdo con los límites resumidos en el cuadro 4.

Cuadro 4. Límites de aceptabilidad para la verificación de métodos de referencia cualitativos.

Característica de desempeño	Verificación bajo AVM		Verificación bajo AAL
	Verificación de la implementación	Verificación del producto	Verificación del producto
eLOD ₅₀	Para protocolos 1 y 2: eLOD ₅₀ ≤ 4 x LOD ₅₀ del estudio de validación.		Para protocolos 1 y 2: eLOD ₅₀ ≤ 4 UFC/porción de ensayo

Fuente: ISO 16140-3:2021. ⁴

Leyenda: AM: alcance del método, AVM: alcance de la validación del método, AAL: alcance de aplicación del laboratorio, eLOD₅₀: límite de detección estimado para el 50% de probabilidad de detección, UFC: unidades formadoras de colonias.

Implementación

Para la implementación del procedimiento se seleccionó el método ISO 6579-1, para detección de *Salmonella* spp.

Como se observa en la figura 3: (1) el método es aplicable a productos incluidos en las 18 categorías descritas en ISO 16140-3; (2) el método está parcialmente validado, en la revisión del método se constató que el estudio de validación involucró productos de cuatro categorías, estos fueron: cuajada de queso fresco (categoría, “productos lácteos y leche cruda”); huevo deshidratado (categoría, “huevo y productos (derivados) de huevo”); carne cruda de aves de corral (categoría, “aves de corral crudas y productos de aves de corral listos para cocinar”); heces de pollo y de cerdo, y calzas altas (categoría, “muestras de la producción primaria”); (3) el laboratorio realizó la determinación de *Salmonella* spp., en alimentos de las dos primeras categorías mencionadas dentro del AVM, de acuerdo con la norma NC 585; solo el alimento huevo deshidratado estudiado en la validación, se encontró también en el AAL; (4) el laboratorio analiza además, alimentos que se encuentran dentro de once categorías que no se incluyeron en el estudio de validación; así como, muestras del ambiente en el área de producción y manipulación de alimentos, que pertenecen a “otra categoría”.

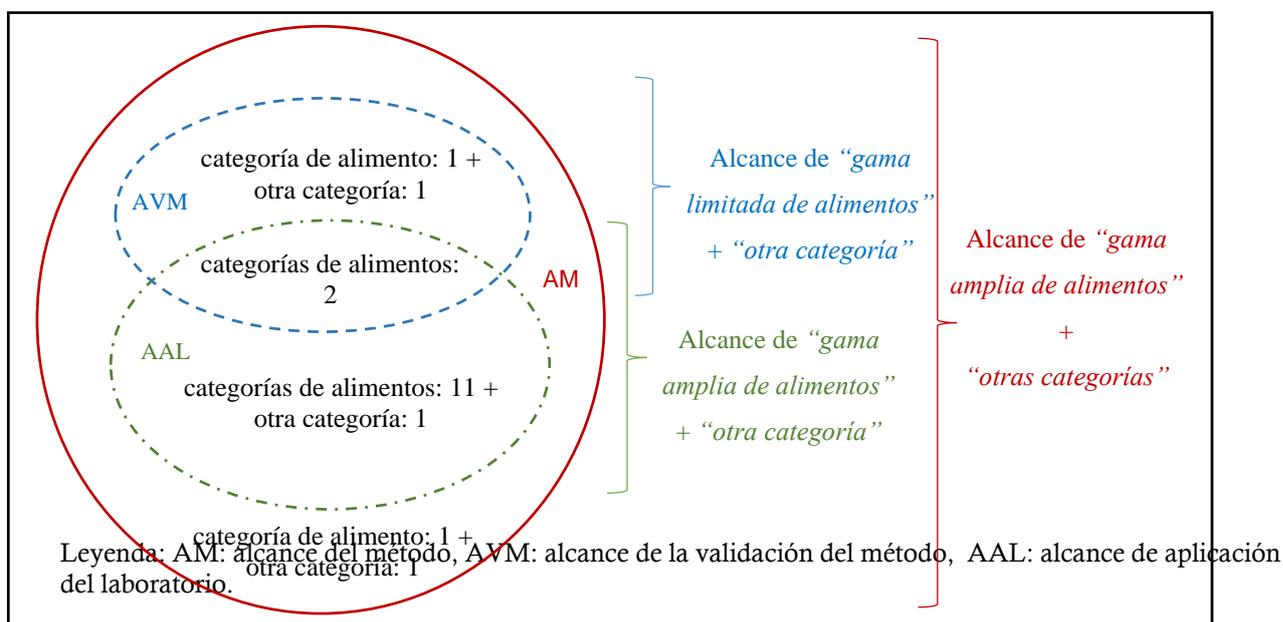


Fig. 3. Alcances involucrados en la verificación del método ISO 6579-1 para detección de *Salmonella* spp., en la Sección de Microbiología Sanitaria del INHEM.

En el cuadro 5 se especifican los aspectos identificados cuando se seleccionaron los alimentos para llevar a cabo las actividades de verificación, de acuerdo con el procedimiento elaborado.

Cuadro 5. Alimentos seleccionados para la verificación. Criterios de selección.

Tipo de verificación	NC 585	ISO 16140-3		ISO 6579-1	
	Grupo	Categoría de producto	Alimento	Criterios de selección	LOD ₅₀ informado UFC/porción de ensayo
Bajo el AVM	9 – Huevos y derivados	Huevo y productos (derivados) de huevo	Huevo deshidratado	Alimento analizado en la validación dentro del AAL.	6,0
	1 – Leche y productos lácteos	Productos lácteos y leche cruda	Queso fresco	Alimento desafiante dentro del AVM y del AAL. Solubilidad Contenido de grasa, Microbiota acompañante.	Sin datos de validación publicados
Bajo el AAL	13 – Alimentos listos para el consumo	Productos cárnicos listos para comer,	Carne de res cocinada	Alimento no desafiante dentro del AAL. Contenido de nutrientes, Carne magra.	Sin datos de validación publicados
	2 – Carnes y productos cárnicos	listos para recalentar	Mortadela	Alimento desafiante dentro del AAL. Aditivos, Contenido de grasa, Microbiota acompañante.	

Leyenda: AVM: alcance de la validación del método, AAL: alcance de aplicación del laboratorio, NC: Norma Cubana, ISO: Organización Internacional de Normalización, LOD₅₀: límite de detección para el 50% de probabilidad de detección, UFC: unidades formadoras de colonias.

El diseño experimental elaborado en los protocolos de verificación contempló la contaminación de las muestras con un cultivo de *Salmonella* Typhimurium, del banco de trabajo del cepario del Laboratorio de Control de la Calidad del INHEM. Se aplicó el diseño experimental correspondiente al protocolo 1 de la norma. Los resultados de eLOD₅₀ cumplieron el criterio de aceptación en la verificación del método de detección de *Salmonella* spp.

DISCUSIÓN

La Sección de Microbiología Sanitaria del INHEM tiene implementado un sistema de gestión de la calidad en base a la norma NC ISO/IEC 17025. Los resultados de la lista de chequeo indicaron que el laboratorio cumple los requerimientos necesarios para la correcta verificación de los métodos de ensayo en relación con las instalaciones y los suministros; así como los vinculados al aseguramiento de la validez de los resultados de equipos e instrumentos de medición, medios de cultivo, soluciones, reactivos, y de las cepas de microorganismos que emplea.^{3, 8-11}

Las debilidades en el sistema de gestión de la calidad del laboratorio se evidenciaron en dos requisitos de la norma NC ISO/IEC 17025, para los cuales se acometieron las acciones correctivas. Para dar cumplimiento al requisito 6.2.6 se establecieron como criterios de competencia para el personal que se designó a realizar las verificaciones que: estuviera autorizado a realizar el ensayo, y contara con la capacitación y experiencia requeridas, para así garantizar la correcta aplicación del procedimiento. En el análisis del requisito 7.2.1 se tuvo en cuenta la declaración en el manual de la calidad (con el código DSC.MS.01, del uso de métodos de

referencias actualizadas, los cuales se llevan a cabo exactamente como están descritos en la normativa; por ello es posible la verificación de dichos métodos por la norma ISO 16140-3, y poder cumplir con el requisito 7.2.1.5.³

Se diseñó la estructura piramidal de la documentación como se observa en la figura 2. Considerando el alcance de aplicación de “amplia gama” más “otras categorías” que tiene el laboratorio para la mayoría de los métodos que realiza, se determinó la factibilidad de la elaboración de un procedimiento único que sustentara a los protocolos de trabajo, para dar cumplimiento a la verificación de los productos que se analizan en el laboratorio para los diferentes métodos.⁴

El procedimiento incluyó explicaciones que responden al orden práctico, de acuerdo con la experiencia del laboratorio con el fin de facilitar la comprensión de la norma ISO 16140-3. Cualquier aclaración necesaria puede encontrarse en los 21 términos y definiciones de la norma, algunos exclusivos del estándar, entre ellos: eLOD₅₀, AAL y laboratorio usuario, relacionados con este trabajo.⁴

En el desarrollo experimental del procedimiento de verificación se consideraron tres aspectos para la selección correcta de los productos (alimentos), estos fueron: el principio de la verificación, la ubicación del producto (alimento) en la categoría implicada, y los efectos de la matriz a considerar.

La norma 16140-3 propone dos protocolos técnicos que enfocan la selección de los productos sobre principios diferentes.⁴

En primera instancia, la verificación de un método debería estar antecedida por su validación, de forma tal que el laboratorio usuario pueda demostrar que el método validado es aplicable, cuando se ejecuta bajo las condiciones de este. La verificación bajo el AVM se desarrolla en dos etapas. Inicia con la verificación de la implementación para demostrar que los resultados del laboratorio usuario son comparables con los datos de la validación; prosigue con la verificación de los productos, para corroborar la competencia del laboratorio para realizar el método con los productos (alimentos) que son rutinariamente analizados. Por esta razón, en la figura 2, este protocolo aplicó a todos los productos dentro del AAL en los ejemplos A y B; mientras que en C se limita a los que se encuentran en el conjunto del AVM que incluye el AAL. Para los otros productos (alimentos) del ejemplo C y para todos los de D, entonces se realiza solo la verificación de los productos (alimentos) para demostrar que el laboratorio es capaz de ejecutar el método con aquellos que analiza en su rutina.

Sin dudas, este proceder brindó una solución a la limitante de poder verificar métodos no (totalmente) validados aún para los laboratorios que aspiran acreditar sus métodos de ensayo. Aunque, no es menospreciable el gasto de tiempo y recursos que se debe asumir para cubrir las verificaciones, sobre todo cuando el alcance de aplicación es de “amplia gama”, esta actividad debe ser cuidadosamente planificada por el laboratorio.

La realización de las verificaciones por el AAL tiene un carácter temporal. La norma ISO 16140-3 se encuentra en la etapa de transición de la implementación, hasta el 31 de diciembre del 2027, posterior a esta fecha sólo se admitirá que la verificación de los métodos de referencia esté antecedida por su validación. Debe denotarse que el método acreditado antes de esta fecha, no necesitará verificarse nuevamente una vez completado el plan de transición; a no ser que se realicen cambios en la temperatura, tiempo de incubación, medios de cultivo, entre otros, y que estos una vez realizada la validación, tengan impacto en las características de desempeño, o si se incorporan en el AAL nuevas matrices que impliquen ampliar el alcance de la acreditación.¹²⁻¹⁴

El segundo aspecto se relaciona con las categorías de los productos (alimentos) del anexo A de la norma ISO 16140-3 (que también aparecen en la norma ISO 16140-2). Esta clasificación responde a los cuatro grandes grupos de productos para los que aplican las normas de microbiología en la cadena alimentaria; y a las principales propiedades físico-químicas de los alimentos de consumo humano. El anexo incluye, los tipos de productos (alimentos), algunos ejemplos y los microorganismos indicados a estudiar para cada categoría.^{4,15}

El procedimiento de verificación indica que se vinculen los productos (alimentos) con las categorías del anexo A de la norma ISO 16140-3 y se analice dentro los tres alcances (AM, AVM y AAL), a cuáles corresponden. En Cuba, particularmente, se recomienda consultar la norma NC 585, de cumplimiento obligatorio, la cual establece los criterios microbiológicos de los alimentos de consumo humano y animal, con el fin de correlacionar los datos de interés en los 17 grupos de este documento normativo con los de la norma ISO 16140-3, para la identificación de los alimentos de consumo humano en el AAL.^{4,7}

Se constató que en 13 grupos de alimentos de la norma NC 585, se exige la determinación de *Salmonella* spp.; los alimentos de estos grupos, que son de interés del laboratorio, correspondieron a igual número de categorías de la norma ISO 16140-3. De los tres los alimentos estudiados en la validación del método, en el laboratorio solo se realiza la determinación de *Salmonella* spp., al huevo deshidratado, incluido en el grupo 9

“Huevos y derivados” de la norma NC 585, de ahí que fuera este el alimento elegido para realizar la verificación de la implementación.^{4,7}

Respecto a las características de la matriz, tercer aspecto a considerar, debe señalarse que las características desafiantes se deben escoger atendiendo al objetivo que persigue el método que se verifica, excepto para el alimento implicado en la verificación de la implementación, el cual está establecido por la norma, ya que este tipo de verificación requiere realizarse en una matriz validada para poder comparar los resultados. En general, se deben seleccionar alimentos con más de una característica desafiante que pueda interferir en el resultado del análisis. El Anexo B de la norma ISO 16140-3, explica las características desafiantes intrínsecas en un alimento, determinadas por las características microbiológicas, las fisicoquímicas, y las inducidas en el proceso de manufactura.^{4,12-14}

En la práctica, la selección del alimento representativo de los que se analizan en el laboratorio, para la verificación del producto bajo el AVM se concretó con el estudio del queso frescal; en esta matriz se identificaron características desafiantes como, la estructura física, el alimento no se disuelve de forma efectiva; la composición supera el 30% de grasa de acuerdo con la ficha técnica; y, en particular, la muestra analizada presentó una concentración de microorganismos coliformes de $1,4 \cdot 10^2$ UFC/g, según lo informado por el laboratorio. Para la verificación bajo el AAL, se seleccionó una carne cocida la cual, por su composición y carga microbiana (inferior a 10^2 UFC de microorganismos a 30°C/g), no debía afectar la recuperación del cultivo inoculado; el otro alimento elegido fue mortadela, las características intrínsecas desafiantes consideradas fueron: la concentración de cloruro de sodio y de nitrito, de 1,0 a 3,0 ppm y 125 ppm, respectivamente; así como, el porcentaje de grasas del 27%, declaradas por el cliente en la ficha técnica del producto; en la muestra analizada la concentración de microorganismos a 30°C fue de $1,3 \cdot 10^3$ UFC/g.

Respecto a los diseños experimentales para la determinación del eLOD₅₀ debe aclararse que la norma 16140-3 incluye un tercer protocolo, que implica el uso de material de referencia con concentración conocida del microorganismo, no disponible en el laboratorio.⁴ Vale señalar que mientras más bajo es el valor de eLOD₅₀ mayor será la capacidad para detectar con precisión bajas concentraciones del microorganismo con dicho método.

La implementación del procedimiento permitió una mayor comprensión y aplicabilidad en el laboratorio, los protocolos de verificación se llevaron a cabo correctamente. El proceso demostró la idoneidad del método analítico para su propósito de uso y garantizar que los resultados obtenidos en los análisis de rutina, están dentro de un valor verdadero o veracidad determinada, para el parámetro que se está midiendo en una muestra.

CONCLUSIONES

La metodología aplicada en el laboratorio de microbiología sanitaria del INHEM, facilitó la interpretación e implementación de la norma ISO 16140-3 y el cumplimiento de los requisitos de la norma NC ISO/IEC 17025 relacionados con la verificación de métodos de referencia microbiológicos cualitativos estandarizados. Esta metodología sirve de experiencia a otros laboratorios que realicen análisis microbiológicos de alimentos para garantizar adecuados estándares de calidad y contribuir con la seguridad alimentaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pérez Álvarez HM, Lobelles Sardiñas GO. Metodología para la transición de NC ISO/IEC 17025:2017 en Refinería Cienfuegos S.A mediante técnicas prospectivas. Universidad y Sociedad [Internet]. 12mar.2020 [citado 28sep.2023]; 12(2): 160-73. Available from: <https://rus.ucf.edu.cu/index.php/rus/article/view/1495>
- Cartaya A, Hirigoyen DJ y Purtscher I. Sistemas de gestión de calidad ISO/IEC 17025 y validación de métodos de análisis: beneficio para los usuarios. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria [Internet]. 2021 [citado 28 sept.2023] Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/consulta/busca?b=pc&id=62415&biblioteca=vazio&busca=62415&qFacets=62415>
- NC ISO/IEC 17025:2017 (traducción oficial). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y/o calibración. Oficina Nacional de Normalización (NC); 2017.
- ISO 16140-3:2021. Microbiology of the food chain - Method validation – Part 3: Protocol for verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. International Organization for Standardization; 2021.
- UNE-EN ISO 6579-1: 2017. Microbiología de la cadena alimentaria — Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*. Parte 1: Detección de *Salmonella* spp. (ISO 6579-1:2017). Asociación Española de Normalización; 2017

- UNE-EN ISO 6579-1:2017/A1:2020. Microbiología de la cadena alimentaria — Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de Salmonella. Parte 1: Detección de Salmonella spp. Modificación 1: Ampliación del rango de temperaturas de incubación, modificación del estado del anexo D y corrección de la composición de los medios MSRV y SC (ISO 6579-1:2017/Amd 1: 2020). Asociación Española de Normalización; 2021.
- NC 585:2017. Contaminantes microbiológicos en alimentos - Requisitos sanitarios. Oficina Nacional de Normalización (NC); 2017.
- POL 2:2021. Política de trazabilidad de las mediciones. Órgano Nacional de Acreditación de la República de Cuba (ONARC); 2021.
- NC ISO 7218:2013. Microbiología de alimentos de consumo humano y Animal — Requisitos generales y guía para los exámenes microbiológicos (ISO 7218: 2007, idt). Oficina Nacional de Normalización (NC); 2013.
- NC ISO 11133:2021. Microbiología de los alimentos de consumo humano y animal; y del agua — Preparación, producción, almacenamiento y pruebas de desempeño de medios de cultivo (ISO 11133:2014/Amd.1:2018, (E)/Amd.2:2020 (K)). Oficina Nacional de Normalización (NC); 2021.
- DD4 A. Anexo A Criterios para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Órgano Nacional de Acreditación de la República de Cuba (ONARC); 2019.
- Transition period for the implementation of ISO 16140-3. [Internet] versión: 2021-01-19. International Organization for Standardization; [Internet] 2021 [Consultado 28 Jul 2023] Disponible en: https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/Transition_period_for_the_implementation_of_ISO_16140-3_version_20210119.pdf
- Presentation: Overview of ISO 16140-3 ‘Method verification’ – improving confidence in laboratory results (PDF). International Organization for Standardization; [Internet] 2021 [Consultado 28 Jul 2023]. Disponible en: https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/2%20Presentation_Overview_ISO_16140-3_Method_verification_20210322.pdf
- Presentation: “Deep dive” into ISO 16140-3 ‘Method verification’ – an extended training for improving confidence in laboratory results (PDF) . International Organization for Standardization; [Internet] 2021 [Consultado 22 jun. 2023]. Disponible en: https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/3%20Training_Deep_dive_ISO_16140-3_Method_verification%2020210322.pdf
- ISO16140-2:2016. Microbiology of the food chain - Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. International Organization for Standardization; 2016.

No existe conflicto de intereses entre las autoras

CONTRIBUCIÓN AUTORAL

Tamara K. Martino Zagovalov: Conceptualización, investigación, curación de datos, redacción del borrador original.

Virginia Leyva Castillo Investigación, curación de datos, revisión del borrador original.

Marianela Ramón Corría Curación de datos Revisión del borrador original.

Yamila Puig Peña Curación de datos Revisión del borrador original.

Yaumara Ferrer Márquez: Curación de datos Revisión del borrador original.

Heidy Toledo León: Curación de datos Revisión del borrador original.

Thais Hernandez Gómez: Curación de datos Revisión del borrador original.