

INDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN	1
3. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO	2
3.1. Métodos Normalizados y basados en métodos normalizados (Clausula A.3.1 del CGA-ENAC-LEC) .	2
3.2. Métodos desarrollados por el laboratorio (Clausula A.3.2 del CGA-ENAC-LEC)	3
4. ESTIMACIÓN DE INCERTIDUMBRE	3
5. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE ENSAYO	3
5.1. Control interno	4
5.2. Control externo (intercomparaciones)	4
6. REFERENCIAS	5

ANEXO I: CEPAS DE REFERENCIA

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo y realización de análisis de control microbiológico es una herramienta que tiene una repercusión decisiva en el ámbito de la salud pública, la tecnología alimentaria y el Medio Ambiente.

Los criterios de acreditación de ENAC deben mantenerse siempre en línea con las tendencias que las comunidades científica y tecnológica establecen como más apropiadas, establecidas en este caso por métodos de referencia, como normas y documentos similares. Por ello ENAC ha publicado una nueva revisión del documento CGA-ENAC-LEC "Criterios Generales de Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración" que complementa a la norma UNE-EN ISO/IEC 17025. Esta nueva revisión, incluye como novedad un anexo que tiene por objeto documentar los criterios de evaluación que ENAC viene utilizando a la hora de determinar si el laboratorio ha demostrado de manera adecuada la validez de los métodos para los que solicita la acreditación. Por este motivo se actualiza esta Nota Técnica eliminando el apartado relativo a métodos de ensayo ya que los criterios que establecía actualmente se encuentran recogidos en el citado Anexo I del CGA-ENAC-LEC.

Así los métodos alternativos, que son aquellos 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 que son generalmente reconocidos por la comunidad científica y tecnológica como equivalentes al método de referencia, se consideran como **métodos normalizados** de acuerdo a la definición establecida en el apartado A.2 del Anexo I del CGA-ENAC-LEC.

2. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

El CGA-ENAC-LEC establece las evidencias de las que los laboratorios deben disponer para demostrar la validez de los métodos de ensayo que pretenden acreditar. Este documento complementa al CGA-ENAC-LEC y su objetivo es establecer con mayor precisión los criterios a utilizar por ENAC para la acreditación de los laboratorios que realizan ensayos microbiológicos.

No debe entenderse esta nota como un documento en el que se establece una metodología para la validación de métodos de ensayo sino como unas directrices que faciliten tanto la implantación en los laboratorios de los aspectos aquí recogidos, como su evaluación por parte de ENAC.

En la elaboración de este documento han participado la Sociedad Española de Microbiología (SEM), la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM) y la Asociación de Entidades de Ensayo, Calibración y Análisis-FELAB – (EUROLAB-España-Asociación Española de Laboratorios de Ensayo, Calibración y Análisis / AELI – Asociación Española de Laboratorios Independientes). Asimismo, se ha previsto la posibilidad de incorporar anexos a este documento, relativos a cuestiones técnicas de interés, elaborados en su caso, en colaboración con organizaciones técnicas competentes.

Asimismo, se incluye un anexo sobre manipulación y conservación de cepas referencia, elaborado en colaboración con la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

3. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO

3.1. Métodos Normalizados y basados en métodos normalizados (Clausula A.3.1 del CGA-ENAC-LEC)

A continuación se indican las características de funcionamiento que al menos se deben confirmar en estos casos teniendo en cuenta la naturaleza del método:

- Métodos cuantitativos:

- **Recuperación**

En cuanto a la estimación de la recuperación debería evaluarse a partir de valores de referencia. Estos valores podrían obtenerse por comparación con métodos de referencia, a partir de muestras inoculadas con materiales de referencia o cepas de referencia o a partir de resultados de interlaboratorios.

- **Reproducibilidad**

Se considera una referencia adecuada las pautas establecidas en el documento técnico ISO/TS 19036

Hay que tener en cuenta que, se debe realizar el cálculo de la precisión (reproducibilidad) en muestras con diferentes niveles de contaminación (ISO/TS 19036).

En el caso de muestras con alto nivel de contaminación se deben realizar las correspondientes diluciones decimales para permitir el recuento de las placas, dentro del intervalo que se establece en documentos de referencia (ej. normas ISO 8199 e ISO 7218)

- Métodos cualitativos:

- **Límite de detección**

La estimación del límite de detección requiere del empleo de suspensiones de inóculo con niveles de concentración bajos. El propio intervalo de confianza a estos bajos niveles hace que, desde un punto de vista estadístico, no se pueda conocer de forma exacta si un determinado inóculo contiene o no el microorganismo a detectar. Por tanto, es aceptable comprobar el método con bajos niveles de inóculos de microorganismos diana de forma que se evalúen diferencias entre las distintas matrices, analistas, equipos etc., verificándose la capacidad del laboratorio para obtener resultados reproducibles y eficaces a estos niveles.

Asimismo, puede obtenerse información sobre las características de funcionamiento de los métodos de:

- *Actividades de control de calidad interno*: Los resultados obtenidos en las actividades de control de calidad interno aplicando el método de ensayo a confirmar, pueden ser utilizados en la comprobación del método (ej. verificación de nuevas matrices).
- *Participación en Intercomparaciones (Control de calidad externo)*: Los resultados obtenidos en la participación en intercomparaciones, también pueden ser utilizados para la comprobación de un método. Para ello, el laboratorio deberá evaluar la idoneidad y calidad del programa de intercomparación, valorando si es adecuado utilizar la información proporcionada por el ejercicio en la comprobación.

Puede tomarse como referencia lo dispuesto al respecto en G-ENAC-09 o ISO/TS 19036.

3.2. Métodos desarrollados por el laboratorio (Clausula A.3.2 del CGA-ENAC-LEC)

La norma UNE-EN ISO/IEC 17025 en su apartado 5.4.2 establece que el laboratorio debe validar los métodos no normalizados y los métodos que diseña o desarrolla para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. Por tanto, para este tipo de métodos, el laboratorio deberá evaluar su idoneidad para su ámbito de aplicación así como las actividades necesarias a realizar para garantizar su validez técnica.

En este sentido las actividades recogidas en el apartado 3.1 que se han considerado como válidas para asegurar la adecuación al uso, no permiten garantizar de forma completa la validez de los métodos internos desarrollados por el laboratorio ni su caracterización ya que éstas deben estar fundamentadas en referencias válidas.

ENAC deberá disponer de evidencias completas de que dichos métodos han sido adecuadamente validados. El laboratorio deberá disponer de toda la información sobre el trabajo experimental realizado para la validación del método.

4. ESTIMACIÓN DE INCERTIDUMBRE

La estimación de Incertidumbre no es de aplicación a métodos cualitativos ni NMP.

En el caso de ensayos microbiológicos de recuento en productos agroalimentarios el documento ISO/TS 19036 puede utilizarse como referencia. En el caso de análisis microbiológico de aguas existe el documento ISO 29201.

5. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE ENSAYO

En la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 se establece que el laboratorio debe disponer de un control de calidad para realizar el seguimiento de la validez de los ensayos.

En el ámbito de los ensayos microbiológicos, la implantación de actividades de control de calidad adecuadas resulta especialmente importante, dado que no siempre es posible caracterizar de forma completa el funcionamiento de estos procedimientos de ensayo. No obstante, es factible establecer sistemas que permitan garantizar el adecuado control de los procedimientos de ensayo microbiológicos.

El aseguramiento de la calidad debe ser tanto interno como externo y puede aplicarse de diferentes formas:

5.1. Control interno

- Control de las condiciones de trabajo: proporciona información sobre la esterilidad de los medios y materiales auxiliares utilizados y en general, sobre la buena práctica en la realización de los ensayos. Deben existir criterios para la desviación permitida.

Ensayos cuantitativos:

- Control de la precisión: muestras naturales sin inocular y/o muestras naturales inoculadas
- Control de recuperación: muestras según lo establecido en el apdo. 3.1 (Recuperación)

Ensayos cualitativos:

- El control de calidad interno debe incluir actividades que garanticen un adecuado control del método a niveles bajos de contaminación (ver apdo. 3.1 Límite de detección)

Estas actividades de control de calidad deben realizarse en la medida de lo posible con muestras naturales tanto positivas (inoculadas o contaminadas naturalmente) como negativas.

5.2. Control externo (intercomparaciones)

La participación en intercomparaciones permite una evaluación del sesgo de forma que el laboratorio pueda demostrar que se mantiene dentro de los criterios de aceptación definidos por normas, reglamentos, por el cliente o por el laboratorio.

Todas las actividades de aseguramiento de la calidad deberán planificarse de forma que, en el tiempo y en función del alcance del método se incluya una adecuada representación de la variedad de matrices con las que trabaja el laboratorio, complementándose así los resultados obtenidos en la validación inicial.

Por último, la periodicidad de las actividades de control de calidad tanto interno como externo deberá establecerse considerando diversos factores como pueden ser:

- La robustez del método utilizado (en función de los controles específicos incluidos en el mismo, método de referencia o de rutina, pruebas de confirmación, datos de validación, vigencia del método etc.)
- La frecuencia con la que el laboratorio ejecuta dichos análisis (dado que se debe asegurar que el laboratorio mantiene la destreza en la ejecución del mismo en cuanto a los materiales, equipos y cualificación del personal)
- Los resultados históricos de aseguramiento de calidad, así como la correcta evaluación de los mismos.
- Los resultados obtenidos en el conjunto de acciones de evaluación de la calidad (ej. siembra por duplicado de placas, verificación del factor de dilución, interlaboratorios, muestras blancas, control de medios de cultivo, controles ambientales, cualificación del personal etc.)

6. REFERENCIAS

- Reglamento (CE) nº 2073/2005, de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- G-ENAC-09 “Guía para la expresión de la incertidumbre en los ensayos cuantitativos”.
- ILAC-G18:04. Guideline for the Formulation of Scopes of Accreditation for Laboratories
- UNE-EN ISO 16140 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Protocolo para la validación de métodos alternativos.
- ISO/TR 13843 “Water quality – Guidance on validation of microbiological methods”.
- UNE-EN ISO 17994 “Calidad del agua. Requisitos para la comparación de la tasa de recuperación relativa de microorganismos por dos métodos cuantitativos”
- UNE-EN ISO 19458 “Calidad del agua. Muestreo para el análisis microbiológico”
- UNE-ISO 8199 “Calidad del agua. Orientaciones generales para el recuento de microorganismos en cultivo”
- ISO/TS 19036 “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations”.
- UNE-EN ISO 6887-1 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y diluciones decimales”.
- UNE-EN ISO 6887-2 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 2: Reglas específicas para la preparación de carne y productos cárnicos”.
- UNE-EN ISO 6887-3 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 3: Reglas específicas para la preparación de pescados y productos de la pesca”.
- UNE-EN ISO 6887-4 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 4: Reglas específicas para la preparación de productos distintos a leche y productos lácteos, carne y productos cárnicos y, pescados y productos de la pesca”.
- UNE-EN ISO 6887-5 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 5: Reglas específicas para la preparación de leche y productos lácteos”.
- UNE-EN ISO 6887-6 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 6: Reglas específicas para la preparación de muestras tomadas en la etapa de la producción primaria”.

- UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 “Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- UNE-EN ISO 11133. “Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua. Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo”
- UNE-EN ISO 7218”Microbiología de los alimentos para consume humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico”
- ISO 29201. “Water Quality – The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods”

“El presente documento se distribuye como copia no controlada. Puede consultar su revisión en la página web de ENAC o internamente en red”.

CEPAS DE REFERENCIA

1. Número de pases que se pueden realizar a una cepa procedente de CC/BRC (Colección de Cultivos Microbianos reconocida o Centro de Recursos Biológicos Microbianos):

- La reconstitución de la cepa y su primera siembra en medio de cultivo es sólo una activación y no debe considerarse un pase.
- La activación es una etapa necesaria y crítica y debe hacerse en los medios de cultivo indicados por la Colección. El laboratorio debe conservar registros de dicha etapa.
- Los pases que se hayan realizado en la Colección de procedencia no deben ser tenidos en cuenta por el laboratorio ni afectan al número de pases que puede realizar (los pases realizados en la Colección forman parte de los "Antecedentes" de la cepa y quedan registrados en la ficha de cada cepa que la Colección debe mantener actualizada).
- El laboratorio debe demostrar que el número de pases que realiza a las cepas no afecta a sus características (en función de su uso previsto). Debe tenerse en cuenta que a mayor número de pases mayor riesgo de contaminación y de que se produzcan mutaciones.

2. Verificación de las cepas procedentes de CC/BRC en el laboratorio:

No es necesario que el laboratorio confirme la identidad de la cepa de referencia ya que ésta viene aportada con el certificado.

Las verificaciones a realizar por el laboratorio dependerán, en cada caso, del uso previsto de la cepa. Por tanto, el laboratorio deberá confirmar en el laboratorio únicamente las características (bioquímicas, morfológicas, etc.) que le afecten según el uso de dicha cepa en su laboratorio. Por otro lado, en cada pase debe evaluarse la viabilidad y la pureza.