

Aplicación de ISO 16140-3:2021 en su laboratorio

Introducción

A los laboratorios de microbiología alimentaria que trabajan por contrato se les pide que realicen pruebas en una amplia gama de alimentos y bebidas. Estos laboratorios tienen que asegurarse de que los métodos que utilizan para realizar las pruebas estén validados y verificados para su uso con los tipos específicos de muestras que analizan de forma rutinaria en sus laboratorios.

La Organización Internacional de Normalización (International Organization for Standardization, ISO) publicó este año una nueva norma centrada en demostrar la competencia del usuario para realizar e implementar los métodos utilizados en los laboratorios: ISO 16140-3:2021 Microbiología de la cadena alimentaria – Validación de métodos – Parte 3: Protocolo para la verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados en un solo laboratorio.¹ La verificación de los métodos que se utilizan de forma rutinaria en los laboratorios es un requisito para los laboratorios acreditados según ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de laboratorios de pruebas y calibración.²

El presente documento es una descripción general de alto nivel de la norma ISO 16140-3:2021 en lo relativo a la verificación y su intención es brindarle orientación con respecto a conceptos clave

contenidos en la norma. Se utilizan dos métodos de 3M validados como ejemplos para aplicar estos conceptos: la 3M™ Prueba de detección molecular-2 *Salmonella* y la 3M™ Petrifilm™ Placa para recuento de Enterobacteriaceae. Este documento introductorio es una descripción general y no pretende reemplazar el uso de la norma ISO para la correcta implementación de esta norma en su laboratorio.

Después de revisar este documento, 3M recomienda ampliamente que revise las siguientes fuentes adicionales de capacitación disponible para profundizar la comprensión y la aplicación de la norma:

- Seminario web de 3M: [Aplicación de la norma ISO 16140-3:2021 en su laboratorio](#)³
- [Sitio web de ISO TC34/SC9](#)⁴, en “Supporting materials” [Materiales de apoyo]:
 - [Grabación](#) de un seminario web de ISO de fecha 2 de marzo de 2020
 - Otros materiales de apoyo disponibles de ISO

Conceptos generales contenidos en la norma

Métodos completamente validados

La norma ISO 16140-3:2021 en materia de verificación de métodos se puede aplicar a métodos que han sido "completamente" validados, lo que significa que se trata de una validación que incluyó tanto un estudio comparativo como un estudio interlaboratorio en comparación con un método de referencia, como se describe a continuación:

- **Estudio comparativo:** un método comparado con un método de referencia, generalmente realizado en un solo laboratorio
- **Estudio interlaboratorio:** un método comparado con un método de referencia, realizado entre muchos laboratorios

Verificación vs. validación

Los términos *validación* y *verificación* a menudo se usan incorrectamente de manera intercambiable, por lo que es importante comprender sus distinciones y definiciones. La verificación del método siempre va después de la validación. Primero se *valida* un método, para demostrar que el método funciona de manera equivalente al método de referencia, con base en criterios clave definidos del método; y luego, antes de que un laboratorio comience a usar el método de forma rutinaria, se debe *verificar* que puedan usar correctamente el método para lograr esos criterios clave del método. En palabras más simples:

- La **validación** es la prueba de que el *método* "funciona"
- La **verificación** es la prueba de que *el usuario* puede llevar a cabo ese método correctamente

Distinción entre alcances

El **alcance** especifica las diferentes categorías, tipos y elementos para los cuales se puede aplicar un método. Existe una distinción entre el alcance de un método, el alcance de la validación de ese método y el alcance de la aplicación de ese método por parte del laboratorio.

El alcance del método corresponde a aquellos productos para los que el método afirma que se puede aplicar. A menudo se asume que el alcance del método para un método de referencia significa que es aplicable para usar con todos los productos. Sin embargo, no todos los métodos de referencia se han validado para su uso con todos los productos.

El alcance de validación se refiere a aquellos productos para los cuales el método afirma que ha sido validado para su uso, a través de un estudio de validación.

El alcance de la aplicación por parte del laboratorio sería aquellos productos que están dentro del alcance de la validación del método y que se prueban de forma rutinaria en ese laboratorio.

Categorías alimentarias y no alimentarias

Como es el caso con muchos métodos de referencia, un método puede afirmar ser válido para usarse con todos los alimentos, pero no es posible validar un método para TODOS los tipos de alimentos que encontramos a nivel mundial, como para poder hacer tal afirmación. Debido a esto, tanto la Asociación Internacional Oficial de Químicos Agrícolas (AOAC INTERNATIONAL) como ISO han acordado usar la frase "amplia gama de alimentos" en vez de la afirmación "todos los alimentos" para los estudios de validación de métodos. Para respaldar esta terminología, cada organización ha definido en conjunto la agrupación general de todos los alimentos en quince categorías (de alimentos) (más tres "otras" categorías no alimentarias), como se muestra en la Figura 1.

Figura 1. Categorías alimentarias y no alimentarias para la validación de métodos de AOAC e ISO

Categorías					
Leche y productos lácteos crudos	Leche y productos lácteos procesados con calor	Carne cruda y productos cárnicos listos para cocinar (excepto aves)	Productos cárnicos listos para comer, listos para recalentar	Carne de ave cruda y productos avícolas listos para cocinar	Productos avícolas listos para comer, listos para recalentar
Huevos y productos a base de huevo (derivados)	Pescados y mariscos crudos y listos para cocinar (sin procesar)	Productos pesqueros listos para comer, listos para recalentar	Verduras y frutas frescas	Frutas y verduras procesadas	Cereales, frutas, frutos secos, semillas y verduras secas
Fórmula para bebés y cereales para bebés	Chocolate, productos de panadería y repostería	Alimentos de varios componentes o componentes de comidas	Alimento para mascotas y pienso	Muestras ambientales (producción de alimentos o piensos)	Muestras de producción primaria (PPS)

- **Amplia gama de alimentos:** Para hacer una afirmación de que un método está validado para el alcance que incluye “una amplia gama de alimentos”, se deben hacer pruebas en un número definido de artículos (alimentarios) de al menos cinco de estas 15 categorías (de alimentos).
- **Gama limitada de alimentos:** Para hacer una afirmación de que un método está validado para menos de cinco categorías (de alimentos) (lo que se define como una “gama limitada de alimentos”), solo se incluyen las categorías (de alimentos) seleccionadas de las 15 categorías (de alimentos) en la validación del método.
- **Otras categorías (no alimentarias):** Para afirmar la validación para una o las tres categorías no alimentarias, también se necesitarían validar artículos adicionales de cada una de estas categorías.

La verificación se realiza en dos etapas:

1. La verificación de la implementación

se realiza primero para demostrar que el laboratorio usuario pueda llevar a cabo el método correctamente. Esto se lleva a cabo con un artículo (alimentario).

- **En el caso de métodos cualitativos,** este único artículo (alimentario) debe ser un artículo que se haya probado durante

el estudio de validación del método y se debe utilizar el mismo tamaño de muestra para este artículo que el que se utilizó durante el estudio de validación.

- **En el caso de métodos cuantitativos,** este único artículo (alimentario) puede ser cualquier artículo (alimentario) que esté dentro del alcance de la validación del método.

2. La verificación de artículos (alimentarios)

demuestra que el laboratorio usuario puede realizar el método con los tipos de artículos (alimentarios) para los que se hacen pruebas de forma rutinaria en el laboratorio del usuario. El número de elementos que se necesitan para realizar la prueba dependerá del número de categorías para las que el laboratorio utilice habitualmente este método.

Debido a que no se hacen pruebas de muchos artículos (alimentarios) durante la verificación, la norma prefiere que el usuario elija alimentos “desafiantes” que se **afirmen** como alimentos incluidos en la validación del método, pero para los que no se hicieron pruebas durante el estudio de validación. Desafiante significa artículos que puedan tener un pH bajo, una baja actividad de agua, una gran cantidad de partículas, etc., es decir, cualquier cosa que pudiera ser inhibitoria (un desafío) para el desempeño del método.

Realización de la verificación de métodos: *Ejemplos*

Verificación de un método CUALITATIVO: 3M™ Prueba de detección molecular-2 *Salmonella*

Paso 1: Definir el alcance de la aplicación por parte del laboratorio

A modo de ejemplo, un laboratorio que quisiera llevar a cabo la verificación de la 3M Prueba de detección molecular-2 *Salmonella* para su uso en dicho laboratorio comenzaría primero por ver a cuales artículos (alimentarios) se les hacen pruebas de *Salmonella* de forma rutinaria en el laboratorio y por determinar en cuántas categorías (alimentarias) se incluyen dichos artículos, con

base en las categorías mencionadas en la figura 1 anterior. En este laboratorio (que se muestra en la figura 2 a continuación) se hacen pruebas de artículos (alimentarios) que caen dentro de una sola categoría (alimentaria) principal: “carne de ave y productos avícolas listos para cocinar”, así como las esponjas de prueba recolectadas del entorno de elaboración, que se incluyen en una de las “otras categorías” (no alimentarias): “muestras ambientales”.

El laboratorio tendrá que hacer pruebas en artículos de ambas categorías para completar la verificación de este método para su uso en dicho laboratorio.

Figura 2. Los artículos (alimentarios) del laboratorio "usuario" – método cualitativo. Los artículos para los que se hacen pruebas aparecen resaltados en color naranja claro.

El laboratorio usuario			
Categoría (alimentaria)	Ubicación 1 Crudos	Ubicación 2 Congelados	Ubicación 3 Listos para cocinar
Carne de ave cruda y productos avícolas listos para cocinar	Pollo molido Pechuga	Sin hueso, sin piel Pechuga, muslos, deditos	Alitas de pollo Condimentadas 1, condimentadas 2, condimentadas 3
	Pavo molido 85% magro, 93% magro	Pechuga de pollo en rebanadas delgadas Condimentadas 1, condimentadas 2, condimentadas 3	Deditos de pollo Empanizadas, condimentadas 1, condimentadas 2, condimentadas 3
	Sin hueso, sin piel Pechuga, filetes, muslos y piernas de pollo	Piezas de pechuga empanizadas Fajitas, condimentadas con hierbas y ajo, barbacoa, pimienta y limón	Trocitos de pollo Empanizadas, condimentadas 1, condimentadas 2, condimentadas 3
	Hueso/piel Pechuga, muslos, piernas y muslos, alitas, piernas		Tiras de pollo Empanizadas, condimentadas 1, condimentadas 2, condimentadas 3
Muestras ambientales (producción de alimentos y piensos)			Espojas de muestreo ambiental (EM) de equipos con caldo de Letheen

Paso 2: Revise los datos de validación del método y elija artículos (alimentarios) para el estudio de verificación

Luego, el laboratorio tendrá que confirmar que se han validado los artículos alimentarios y no alimentarios en los que hacen pruebas de forma rutinaria mediante ya sea el Método oficial de análisis de la AOAC ([AOAC® Official Method of AnalysisSM](#)) y/o algún organismo de certificación ([Validación NF mediante la certificación de la Asociación Francesa de Normalización \[AFNOR\]](#) o [MicroVal](#)) que siga el protocolo definido en la norma ISO 16140-2:2016 Microbiología de la cadena alimentaria – Validación de métodos – Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (de propiedad exclusiva) contra un método de referencia.⁶ El laboratorio entonces debe determinar cuáles artículos se incluyeron en el o los estudios de validación.

Datos de validación de la AOAC

Se accede en dos partes a los datos de validación de la AOAC para la 3M Prueba de detección molecular-2 *Salmonella*. Los datos del estudio comparativo se pueden encontrar en el certificado [AOAC® Performance Tested MethodSM Certificate 091501](#) para el método, que está disponible en el sitio web de la AOAC. Este certificado contiene la lista de artículos (alimentarios) para los que se hicieron pruebas en el estudio comparativo, además de un resumen de los datos. Después de un estudio interlaboratorio del método, se otorga el [AOAC® Official Method of AnalysisSM 2016.01](#), el cual se puede encontrar en el sitio web de 3M Food Safety.

Datos de validación de la ISO 16140-2:2016

Se llevó a cabo la validación de la 3M Prueba de detección molecular-2 *Salmonella* conforme al protocolo de la norma ISO 16140-2:2016 mediante la VALIDACIÓN NF de la Certificación AFNOR. El certificado [AFNOR certificate 3M 01/16-11/16](#) y el [informe resumido del estudio de validación](#) se pueden encontrar en el sitio web de Certificación de la AFNOR.

Artículo (alimentario) para verificación de la implementación: el laboratorio tendrá que seleccionar un artículo (alimentario) probado durante el estudio de validación que también esté dentro del alcance de aplicación del laboratorio usuario. Para la verificación de este método, el laboratorio eligió pechuga de pollo molida cruda.

Artículos (alimentarios) para la verificación de artículos (alimentarios): solo se prueba una categoría (alimentaria) dentro de la aplicación de laboratorio, por lo que el laboratorio solo tiene requerido elegir un artículo (alimentario) para el estudio de verificación de artículos (alimentarios), así como probar esponjas ambientales con caldo de Letheen para verificar la categoría "otros" no alimentarios en su aplicación de laboratorio. Sin embargo, debido a que existen diferentes tipos de artículos (alimentarios) dentro de la categoría (alimentaria) de "Carne de ave cruda y productos avícolas listos para cocinar" que pueden presentar desafíos para la recuperación de un número bajo de *Salmonella*, el laboratorio puede optar por incluir hacer pruebas con artículos (alimentarios) adicionales en su estudio de verificación de artículos (alimentarios), tales como los que aparecen resaltados en la figura 2 anterior.

Paso 3: Verificación de la implementación mediante el nivel estimado de detección al 50% de probabilidad de detección (eLOD₅₀) (Ejemplo: Protocol 1)

Para métodos cualitativos, el LOD₅₀ *estimado* se determina tanto para la implementación *como* para la verificación de artículos (alimentarios). El LOD₅₀ estimado (eLOD₅₀) es una definición exclusiva de la norma ISO 16140-3:2021. El término LOD, que corresponde a las siglas en inglés de nivel de detección, se utiliza para métodos cualitativos de microbiología basados en análisis *replicados* a tres niveles de inoculación distintos del analito objetivo en una matriz. El estudio que se lleva a cabo para la verificación se llama eLOD₅₀ porque aunque el estudio evalúa réplicas a diferentes niveles de inoculación, en el estudio no se analizarán suficientes muestras para cumplir con los requisitos para la determinación de un LOD₅₀ real, como el que se utiliza para la validación del método.

La norma incluye tres protocolos de entre los cuales se puede elegir uno para determinar el eLOD₅₀. En cada uno de los protocolos se preparan e inoculan porciones para prueba. Los protocolos uno y dos requieren el uso de un cultivo desarrollado en el laboratorio para la inoculación de las porciones de prueba en tres niveles: alto, intermedio y bajo. El protocolo tres permite el uso de un material de referencia estandarizado, es decir, inocular con una concentración conocida del microorganismo objetivo, y requiere la inoculación de réplicas a un nivel bajo de inoculación solamente.

A modo de ejemplo, si el laboratorio elige seguir el protocolo uno, primero revisaría el estudio de validación para ver cuál fue el LOD₅₀ para la pechuga de pollo cruda molida y luego determinaría cómo comenzar la inoculación de los artículos (alimentarios). Se deja crecer un cultivo de *Salmonella* durante la noche, se diluye en serie y se siembra en placas para determinar la concentración del inóculo antes de prepararse para diluirlo a las concentraciones de inoculación requeridas para cada nivel (según la norma).

La norma establece que se debe apuntar a la inoculación de 9 veces el LOD₅₀ obtenido en el estudio de validación para el nivel de inoculación alto, de 3 veces el LOD₅₀ para el nivel de inoculación intermedio y de 1 vez el LOD₅₀ para el nivel de inoculación bajo. Si no se obtuvo un LOD₅₀ en el estudio de validación, la norma entonces dice que se deberá asumir un LOD₅₀ de 1 para el nivel de inoculación bajo, para ayudar a determinar los tres niveles de inoculación.

Después de la inoculación, las porciones de prueba deberán analizarse conforme a las instrucciones del método a verificar, en este caso, la 3M Prueba de Detección Molecular-2 *Salmonella*. Luego, el laboratorio debe registrar el número de resultados positivos en cada nivel de inoculación y usar las tablas de números más probables (most probable number, MPN) provistas en la norma para determinar el multiplicador que debe usarse para el nivel de inoculación bajo con el fin de determinar el eLOD₅₀ y evaluar si cumple con los límites de aceptabilidad definidos en la norma.

Debido a que no se indicó ningún LOD₅₀ en el informe de validación del 3M Prueba de detección molecular-2 *Salmonella*, el laboratorio asumió un LOD₅₀ de 1, conforme lo indicado en la norma. Ahora bien, para determinar ahora si las porciones de prueba cumplieron con el límite de aceptabilidad para la verificación de métodos cualitativos, el laboratorio debe mirar la tabla que se incluye en la norma (tabla 16: Límites de aceptabilidad para la verificación de métodos validados) que establece que el eLOD₅₀ debe ser $\leq 4 \times \text{LOD}_{50}$.

ISO ha proporcionado un programa basado en Excel® (hoja de cálculo) que está disponible en el sitio web de ISO TC34/SC9 para hacer cálculos y determinaciones sobre si los resultados de uno cumplen con los límites de aceptabilidad.

Paso 4: Verificación de artículos alimentarios mediante el uso del eLOD₅₀ (Ejemplo: Protocol 1)

Debido a que el LOD₅₀ estimado se usa tanto para la implementación *como* la verificación de artículos (alimentarios), este mismo protocolo se repite para cada uno de los artículos (alimentarios) que sean necesarios para completar la verificación de artículos (alimentarios). Para este laboratorio, eso correspondería a un artículo (alimentario) y un "otro" artículo no alimentario para completar la verificación de cada categoría que este laboratorio afirma probar dentro de su alcance de aplicación.

Verificación de un método cuantitativo: 3M™ Petrifilm™ Placa para recuento de Enterobacteriaceae

Paso 1: Definir el alcance de la aplicación por parte del laboratorio

Para este ejemplo, se utilizará una planta de elaboración que elabora helados, fórmula infantil, pizzas congeladas y pasta refrigerada lista para cocinar, y que recolecta muestras ambientales como parte de su programa de monitoreo ambiental. La clasificación de estos artículos en las 15 categorías de alimentos + tres "otras" categorías mediante el uso de la figura 1 anterior ayuda a determinar que este laboratorio hace pruebas con artículos (alimentarios) de tres categorías (alimentarias) diferentes: "Leche y productos lácteos procesados con calor", "Fórmula para bebés y cereales para bebés", "Alimentos de varios componentes o componentes de comidas", y de una categoría no alimentaria, "Muestras ambientales".

El laboratorio de esta planta de elaboración tendrá que hacer pruebas en artículos de estas cuatro categorías para completar la verificación de este método para su uso.

Paso 2: Revise los datos de validación del método y elija artículos (alimentarios) para el estudio de verificación

Primero, el laboratorio tendrá que confirmar que se han validado los artículos alimentarios y no alimentarios con los que hacen pruebas de forma rutinaria mediante ya sea el Método oficial de análisis de la AOAC ([AOAC® Official Method of AnalysisSM](#)) y/o algún organismo de certificación ([Validación NF mediante la certificación de la Asociación Francesa de Normalización \[AFNOR\]](#) o [MicroVal](#)) que siga el protocolo definido en la norma ISO 16140-2:2016.

Datos de validación de la AOAC

El método oficial de análisis [AOAC® Official Method of AnalysisSM 2003.01](#) para la 3M Petrifilm Placa para

recuento de Enterobacteriaceae se puede encontrar en el sitio web de la AOAC. (Este método no tiene datos de Método de desempeño probado (Performance Tested Method, PTM) porque el método se validó completamente antes de la creación del programa de PTM de la AOAC).

Datos de validación de la ISO 16140-2:2016

La validación de la 3M Petrifilm Placa para recuento de Enterobacteriaceae conforme al protocolo de la norma ISO 16140-2:2016 se llevó a cabo mediante la VALIDACIÓN NF de la Certificación AFNOR. El certificado [AFNOR Certificate 3M 01/06-09/97](#) y el [informe resumido del estudio de validación](#) se pueden encontrar en el sitio web de Certificación de la AFNOR.

Artículo (alimentario) para verificación de la implementación: el laboratorio seleccionará un artículo (alimentario) dentro del alcance del método de validación que también esté dentro del alcance de aplicación del laboratorio. Para la verificación de este método, el laboratorio elegirá helado de vainilla porque se homogeneiza fácilmente para dividirlo en porciones de prueba.

Artículos alimentarios para la verificación de artículos (alimentarios): el laboratorio seleccionará un artículo (alimentario) desafiante de cada una de las tres categorías (alimentarias) identificadas, además de un artículo de la categoría no alimentaria para completar la verificación de este método. Para este ejemplo, el laboratorio elegirá helado de vainilla con trocitos de chocolate y almendras, leche en polvo deshidratada y tortellini de espinaca y queso listo para cocinar, para verificar cada una de las tres categorías (alimentarias) que afirma están validadas para el método, así como hisopos con caldo de Letheen para verificar la categoría no alimentaria.

En la figura 3 que aparece a continuación se resaltan los artículos (alimentarios) elegidos tanto para la implementación como para la verificación (de alimentos).

Figura 3. Los artículos (alimentarios) del laboratorio "usuario" – método cuantitativo. Los artículos para los que se hacen pruebas aparecen resaltados en los recuadros de color naranja claro.

El laboratorio usuario				
Categorías (alimentarias)				
Productos lácteos procesados con calor	Fórmula para bebés	Alimentos de varios componentes/ compuestos		Muestras ambientales
Helado de vainilla	Cereal para bebés con trigo, avena, azúcar, arroz	Pizza de queso congelada	Pasta lista para cocinar	Esponjas con caldo de Letheen
Helado de vainilla con remolinos de chocolate	Leche deshidratada en polvo	Pizza suprema congelada	Tortellini de espinaca y queso listo para cocinar	Hisopos con caldo de Letheen
Helado de vainilla con trocitos de chocolate y almendras	Fórmula láctea a base de suero de leche para bebés	Pizza de salchicha y anchoas congelada	Tortellini de queso listo para cocinar	

Paso 3: Verificación de la implementación: Desviación estándar de la reproducibilidad interlaboratorio (S_{IR})

La verificación de la implementación de métodos cuantitativos se logra mediante la determinación de la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio, expresada como S_{IR} ("intra" significa dentro de un mismo laboratorio, en comparación con "inter", que significa entre varios laboratorios, como se realiza durante la validación del método).

Para este estudio, el laboratorio elegirá un artículo (alimentario) dentro del alcance del método de validación que también esté dentro del alcance de aplicación del laboratorio. El laboratorio primero tendrá que recolectar un mínimo de diez tipos diferentes de muestras de helado de vainilla para tener una variedad de helados de vainilla como la que se esperaría que llegara al laboratorio de manera rutinaria. Las muestras pueden ser helados de diferentes lotes, fabricantes, días de producción, etc. Se pueden recolectar más de diez muestras para asegurar suficientes muestras y suficiente variedad.

Se deja crecer un cultivo de *Enterobacteriaceae* durante la noche y luego se hacen diluciones en serie y se siembran en placas para determinar los niveles de inoculación. Cada una de las muestras de helado de vainilla se homogeneiza completamente y luego se divide en dos porciones de prueba: A y B. A continuación, cada conjunto de porciones de prueba se inocula con un rango de contaminación que normalmente se encontraría

en las muestras que se analizan de forma rutinaria en el laboratorio (entre 30 ufc/g y 30 000 ufc/g). Debido a que este estudio se está llevando a cabo en un solo laboratorio, el laboratorio debe hacer que el análisis de las porciones de prueba A y B sea lo más diferente posible de tantas formas como sea posible: utilizando diferentes técnicos, incubadoras, lotes de medio de cultivo (diferentes preparaciones del mismo lote de medio de cultivo en polvo), etc.

Entonces, se analiza cada una de las porciones de prueba de muestra mediante el método de la 3M Petrifilm Placa para recuento de Enterobacteriaceae. Los resultados se registran y se utilizan para calcular la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio S_{IR} utilizando la fórmula provista en la norma o el programa basado en Excel® (hoja de cálculo) que está disponible en el sitio web de ISO TC34/SC9.

En el informe del estudio de validación para el método 3M Petrifilm Placa para recuento de Enterobacteriaceae, el laboratorio localizará la desviación estándar de reproducibilidad interlaboratorio (S_{IR}) más baja de los artículos (alimentarios) utilizados en el estudio de validación y la comparará con el S_{IR} calculado que se haya obtenido. En la figura 4 que aparece a continuación, se encontró que el valor medio más bajo de S_{IR} en el estudio de validación para este método era de 0,125 (0,126 + 0,122 + 0,126 = 0,125).

La S_{IR} debe ser ≤ 2 veces el S_{IR} más bajo para cumplir con los límites de aceptabilidad para la verificación de la implementación.

Figura 4. Informe del perfil de precisión según AFNOR del método alternativo 3M Petrifilm Placa para recuento de Enterobacteriaceae

Método alternativo			
Niveles	Bajo	Medio	Alto
Valor objetivo	2,274	3,238	4,191
Número de participantes (K)	14	14	14
Promedio para el método alternativo	2,224	3,244	4,223
Desviación estándar de repetibilidad (sr)	0,122	0,110	0,104
Desviación estándar interlaboratorio (sL)	0,031	0,052	0,071
Desviación estándar de reproducibilidad (sR)	0,126	0,122	0,126

Paso 4: Verificación de artículos alimentarios mediante el uso de eBias

La verificación de artículos (alimentarios) para métodos cuantitativos se logra mediante la determinación del sesgo estimado (eBias), que es otra definición exclusiva de la norma ISO 16140-3:2021. No es posible determinar de forma precisa el sesgo (como se hace en los estudios de validación) debido al pequeño número de muestras que se analizarán en el estudio de verificación. Por lo tanto, el término **eBias** se utiliza para el estudio de verificación.

Para llevar a cabo la verificación de artículos (alimentarios), el laboratorio utilizará los tres artículos (alimentarios) desafiantes y el artículo no alimentario (hisopos con caldo de Lethen) seleccionados a partir de la revisión de las categorías en el alcance de aplicación del laboratorio.

Cada artículo (alimentario) se contaminará artificialmente a tres niveles de inoculación que cubren el rango de uso del método tal como se usa habitualmente en el laboratorio (por ejemplo: 30-300, 300-3.000 y 3.000-30.000 ufc/g). Cada uno de estos tres niveles se realizará por *duplicado*.

Se deja crecer un cultivo de *Enterobacteriaceae* durante la noche y luego se hacen diluciones en serie y se siembran en placas para determinar los niveles correctos de inoculación. Cuando se diluya la suspensión de inoculación para prepararla para inocular los duplicados de los artículos (alimentarios), se deberán considerar las diluciones adicionales que serán necesarias para lograr recuentos dentro del rango contable del método para cada uno de los tres niveles. Como se ilustra en la figura 5 que aparece

a continuación, el inóculo requiere diluirse más para lograr los niveles correctos de dilución/recuento para los niveles alto, intermedio y bajo; el inóculo, cuando se mezcla con el volumen del artículo (alimentario), requiere menos dilución.

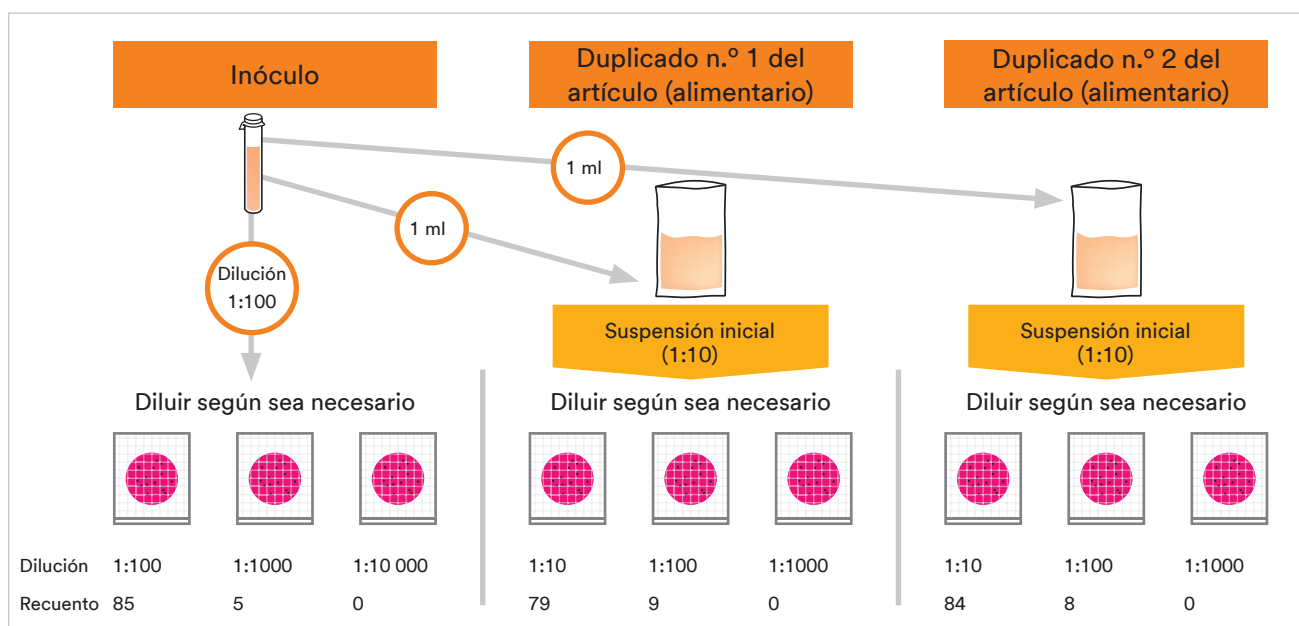
Para calcular el eBias, se realiza y registra la enumeración para:

- El **inóculo** en los tres niveles
- El **artículo (alimentario) con** inóculo en los tres niveles
- El **artículo (alimentario) sin** inóculo por duplicado (como control negativo) para determinar el nivel de microbiota anterior (en su caso) que se encuentra en el artículo (alimentario).

Para cada uno de los tres niveles, se promedian los recuentos de los duplicados de los artículos (alimentarios) y se hace una transformación de \log_{10} para determinar el \log_{10} de ufc/g para cada nivel. Luego, estos resultados se expresan en \log_{10} de ufc/**porción de prueba** para cada nivel y se comparan con la transformación logarítmica del recuento de ese *mismo* nivel de inóculo determinado para cada nivel *sin* el artículo (alimentario). El eBias es la diferencia absoluta en los resultados entre el artículo (alimentario) inoculado y el inóculo.

Para cumplir con los límites de aceptabilidad para eBias conforme a la norma, la diferencia absoluta para cada nivel debe ser $\leq 0,5 \log_{10}/\text{ml}$. Nuevamente, el programa basado en Excel® (hoja de cálculo) está disponible en el sitio web de ISO TC34/SC9 para que ingrese sus datos y le ayude a completar todos los cálculos para determinar si cumple con los límites de aceptabilidad.

Figura 5. Protocolo de verificación cuantitativa de artículos (alimentarios) con 3 niveles de inóculo



Ayuda adicional:

Si necesita ayuda para aplicar esta nueva norma en su laboratorio, póngase en contacto con 3M y acceda a los materiales de apoyo que están disponibles en el [sitio web de ISO TC34/SC9](#).

Conecte con un experto en soluciones 3M para conocer más sobre el programa de apoyo para laboratorios por contrato

Obtenga más información sobre las soluciones de 3M para Laboratorios por contrato

Referencias

1. Organización Internacional de Normalización. 2021. ISO 16140-3:2021. Microbiología de la cadena alimentaria – Validación de métodos – Parte 3: Protocolo para la verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados en un solo laboratorio [ISO – Normas](#)
2. Organización Internacional de Normalización. 2017. ISO/IEC 17025:2017. Requisitos generales para la competencia de laboratorios de pruebas y calibración [ISO – Normas](#)
3. Seminario web de 3M Food Safety. 2021. Aplicación de la norma ISO 16140-3:2021 en su laboratorio
4. Sitio web de ISO TC34/SC9 (consultado el 24 de junio de 2021): [Sitio web de ISO TC34/SC94 en "Supporting materials" \[Materiales de apoyo\]](#)
5. AOAC INTERNATIONAL. 2012. Apéndice J: Lineamientos del Comité de Métodos para la Validación de Métodos Microbiológicos para Superficies Alimentarias y Ambientales de AOAC INTERNATIONAL
6. Organización Internacional de Normalización. 2016. ISO 16140-2:2016. Microbiología de la cadena alimentaria – Validación de métodos – Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (de propiedad exclusiva) contra un método de referencia [ISO – Normas](#)
7. Sitio web de ISO TC34/SC9 (consultado el 24 de junio de 2021): Programa basado en Excel® (hoja de cálculo) en el [sitio web de ISO TC34/SC9 en "Supporting materials" \[Materiales de apoyo\]](#)

Este documento técnico tiene por único objeto brindar una orientación general. La información técnica, las recomendaciones y otras declaraciones contenidas en este documento se basan en experiencia e información que 3M considera fiables, pero no se garantiza la exactitud ni integridad de dicha información. Esta información está destinada a personas con conocimientos y aptitudes técnicas suficientes para evaluar y aplicar su propio juicio fundamentado a la información, considerando la naturaleza de sus actividades comerciales, las políticas vigentes y las leyes y reglamentos particulares que pudieran ser aplicables.



3M Food Safety

3M Center, Building 275-5W-05
St. Paul, MN 55144-1000 EUA

Telephone 1-800-328-6553
Site 3M.com/foodsafety

3M, Petrifilm y MDS son marcas comerciales de 3M.
Utilizadas con licencia en Canadá. © 3M 2021. Todos los derechos reservados.
Recicle. Impreso en los Estados Unidos de América.

70-2011-5266-0