



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA DE SISTEMAS – SISTEMAS DE CALIDAD

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN LOS ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS
CUALITATIVOS

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

P R E S E N T A:
I.Q. MARINA INÉS GASCA LEÓN

TUTOR PRINCIPAL
MA. DE LOS ÁNGELES P. OLVERA TREVIÑO, FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. JUNIO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: DRA. WACHER RODARTE MARÍA DEL CARMEN

Secretario: M.C. ALPIZAR RAMOS MARÍA DEL SOCORRO

Vocal: DR. SAMANO CASTILLO JOSE SABINO

1^{er}. Suplente: DR. BARRAGAN OCAÑA ALEJANDRO

2^{do}. Suplente: DRA. OLVERA TREVIÑO MA. DE LOS ÁNGELES P.

Lugar donde se realizó la tesis: UNIDAD DE METROLOGÍA DE LA FACULTAD
DE QUÍMICA

TUTOR DE TESIS:

DRA. OLVERA TREVIÑO MA. DE LOS ÁNGELES P.

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a DIOS y a la VIRGEN DE GUADALUPE por todo lo que me han dado, fortaleza, persistencia, paciencia pero sobre todo porque en ningún momento he dejado de sentir su presencia.

Agradezco y dedico esta tesis a mi hija FERNANDA por ser el motor de mi vida, por impulsarme a seguir adelante y por enseñarme tantas cosas.

A JOSÉ JUAN MACIP OLVERA por estar presente en mi vida y por acompañarme en este proceso, siempre animándome.

A mis papás porque aún en la distancia siempre me apoyan y confían en mí. Los amo.

A mi hermana LUPE porque siempre está ahí para escucharme, entenderme, aconsejarme, apoyarme en fin por seguir siendo mi mamá chiquita.

A mis amigos y compañeros de trabajo: Amalia, Javier, Inesita, Rosita, Lili, Paty Mary, Elizabeth, Arabel, Georgi, Rosa Ana, Anita, Irazú y Elvia, por echarme porras aún en los momentos difíciles.

A la Doctora ÁNGELES OLVERA, mi tutora, por el tiempo, la paciencia, el apoyo y la dirección de esta tesis en todos estos años.

Al Dr. Víctor Ortiz, Dra. Patricia de Gortari, QFB. Guillermo Ordaz. Maestro René Serrano, QBP. Héctor Sánchez por sus valiosos granitos de arena en la realización de este trabajo.

A mis jefas Lic. Ma. Guadalupe Solís Díaz y M.E. Luz Elena Pale Montero por el apoyo brindado en todos los aspectos para concluir este proceso.

A los miembros del jurado Dra. Carmen Wachter, M.C. Socorro Alpizar, Dr. José Sámano, Dr. Alejandro Barragán por el tiempo dedicado y sus valiosos comentarios.

RESUMEN

Un laboratorio de ensayos microbiológicos debe tener como principales objetivos asegurar la calidad del trabajo que realiza y de los resultados que se generan; esto se logra mediante el uso de métodos exactos y confiables bajo la guía de un sistema de aseguramiento de la calidad.

La primer fase de los sistemas de calidad es la normalización, en el caso de los laboratorios de ensayos es la Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 equivalente a la internacional ISO/IEC 17025:2005 la que establece los lineamientos necesarios para que éstos puedan demostrar que operan con un sistema de calidad, que son técnicamente competentes y que son capaces de generar resultados técnicamente válidos.

Para ensayos microbiológicos, además se ha desarrollado un documento de aplicación que complementa los requisitos especificados en la norma.

Sin embargo, esta norma exige demostrar la seguridad del resultado de medir a través de parámetros de tipo cuantitativo y por lo tanto aquellos métodos de ensayo microbiológico de tipo cualitativo tales como en los que el resultado se expresa en términos de detectado/no detectado presentan ciertas limitantes para cumplir con los requisitos de la norma y demostrar la seguridad de los resultados obtenidos.

El objetivo de este trabajo fue comprobar mediante el análisis de documentos nacionales e internacionales que los requisitos técnicos que plantea la norma y el documento de aplicación son suficientes y pueden ser cumplidos por los laboratorios que realizan análisis microbiológicos de tipo cualitativo y de esta manera asegurar la calidad de los resultados obtenidos.

Para realizar el estudio se seleccionó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aplicada a la detección de microorganismos patógenos transmitidos por alimentos ya que representa una valiosa alternativa para los métodos tradicionales de detección, siendo la velocidad, el límite de detección, la selectividad, especificidad, sensibilidad y el potencial para la automatización sus ventajas más importantes. Sin embargo, para demostrar confiabilidad en los resultados de medir en los laboratorios que usan esta técnica es muy difícil poder cumplir con los lineamientos que exige la normatividad.

Se analizaron y desarrollaron cada uno de los requisitos técnicos de la norma y se propusieron alternativas para cumplir con aquellos requisitos que presentan limitantes por la propia naturaleza del método de ensayo como fueron: la validación, la estimación de la incertidumbre de medida y la determinación de la trazabilidad; generando como resultado un plan integral de implementación de un esquema para dar cumplimiento a cada uno de los requisitos de la norma con la técnica de PCR para la detección de patógenos transmitidos por alimentos y que podrá servir como guía para que los laboratorios que realizan análisis microbiológicos de tipo cualitativo a través de esta técnica puedan asegurar la calidad de sus resultados.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
PROBLEMÁTICA	3
I. ANTECEDENTES	5
I.1. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo.	5
I.2. El laboratorio de ensayos microbiológicos y el aseguramiento de la calidad de los resultados.	9
I.3. Documento de aplicación EA-4/10 “Accreditation for microbiological laboratories”.	10
I.4. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y los métodos de Identificación de microorganismos.	14
I.5. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	18
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
II. REQUISITOS TÉCNICOS DE LA NORMA ISO/IEC 17025:2005 Y LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS	25
II.1. Requisitos técnicos (5)	25
II.1.1. Generalidades (5.1)	25
II.1.2. Personal (5.2)	26
II.1.3. Instalaciones y condiciones ambientales (5.3)	26
II.1.4. Método de ensayo y validación del método (5.4)	27
II.1.5. Equipo y Reactivos (5.5)	30
II.1.6. Trazabilidad de la medición (5.6)	35
II.1.7. Muestreo (5.7)	35

	Pág.
II.1.8. Manejo de los ítems (elementos) de ensayo (5.8)	36
II.1.9. Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo (5.9)	36
II.1.10. Informe de resultados (5.10)	38
III. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS.	40
III.1 Método de PCR para la detección de patógenos transmitidos por alimentos Validación (Demostración de buen funcionamiento o desempeño)	40
III.1.1 Cepas bacterianas de referencia (microorganismos objetivo)	42
III.1.2. Preparación de las muestras de ADN	43
III.1.3. Par de cebadores y PCR	43
III.1.4. Control de Amplificación Interno (CAI)	44
III.1.5. Determinación de la probabilidad de detección	44
III.1.6. Estudio Interlaboratorios usando el par de cebadores más selectivo	46
IV. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS	50
IV.1. Incertidumbre asociada con análisis microbiológicos	51
IV.2. Método de PCR para la detección de patógenos transmitidos por Alimentos: Incertidumbre de medida	54
IV.2.1. Fuentes de incertidumbre	54
IV.2.2. Cuantificación de las fuentes de incertidumbre	55
IV.2.3. Incertidumbre en la toma de decisión	58
V. TRAZABILIDAD EN EL MÉTODO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS	63
V.1. Trazabilidad	63

	Pág.
V.2. Trazabilidad en los laboratorios microbiológicos	64
V.3. Método de PCR para la detección de patógenos transmitidos por alimentos Trazabilidad	65
V.3.1. Cepas de referencia	66
V.3.2. Micropipetas (pipetas de pistón)	67
V.3.3. Espectrofotómetro UV- Vis	71
V.3.4. Termociclador	74
RESULTADOS	77
Plan integral de implementación de un esquema para dar cumplimiento a los Requisitos técnicos de la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 con la técnica de PCR para la detección de patógenos transmitidos por alimentos	
CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	83
ANEXO A	87
Estándares concernientes al enriquecimiento de microorganismos (bacterias)	

INTRODUCCIÓN

Un laboratorio de ensayos microbiológicos es una instalación que cuenta con la capacidad técnica, material y humana para efectuar las mediciones y análisis o determinar las características microbiológicas de materiales, productos o equipos de acuerdo a especificaciones establecidas. Debe tener como principales objetivos asegurar la calidad del trabajo que se realiza y de los resultados que se generan, ya que en cualquier momento del ensayo microbiológico se pueden cometer errores significativos y para prevenirlos es importante identificar los puntos críticos y controlarlos paso a paso a lo largo de todas las etapas del ensayo. Esto se logra mediante el uso de métodos exactos y confiables bajo la guía de un Sistema de Aseguramiento de la Calidad planificado y documentado.

Ahora bien, un Sistema de Aseguramiento de la Calidad se define como un conjunto de actividades planificadas y sistemáticas, equipos, materiales, procesos, documentación y personal requeridos para que las tareas y operaciones se desarrollen asegurando la calidad en sus resultados, disminuyendo al mínimo los efectos de posibles fuentes de error. La primera fase de los Sistemas de Calidad es la Normalización; en el caso de los laboratorios de ensayos es la Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 equivalente a la internacional ISO/IEC 17025:2005 la que establece los lineamientos necesarios para que éstos puedan demostrar que operan con un sistema de calidad, que son técnicamente competentes y que son capaces de generar resultados técnicamente válidos.

Debido a que los requisitos especificados en esta norma son enunciados en términos generales y pueden ser aplicados a todos los laboratorios de ensayo y calibración, para aplicaciones específicas como en el caso de la microbiología, surge la necesidad de generar un documento de aplicación por separado según se establece en el Anexo B de la norma.

El documento de aplicación para los ensayos microbiológicos ha sido elaborado conjuntamente por Eurachem y EA como una forma de promover un enfoque armonizado para la acreditación de los laboratorios, este documento complementa los requisitos establecidos en la norma ISO 17025 con directrices específicas tanto para los auditores como para los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Estas directrices son aplicables a todo tipo de mediciones objetivas, ya sean o no rutinarias o como parte de actividades de investigación y desarrollo. Aunque se han escrito pensando especialmente en análisis microbiológicos de alimentos y medio ambiente, los principios generales pueden aplicarse también a otras áreas como bioquímica, biología molecular y cultivos celulares, aunque esos laboratorios pueden tener que cumplir otros requisitos adicionales.

A pesar que desde el punto de vista metrológico existen diversas guías orientadas hacia el análisis microbiológico, aún deben hacerse más esfuerzos para proponer protocolos de

control de los análisis más seguros, así como metodologías más robustas y eficaces que permitan obtener resultados de forma rápida, segura e independiente.

Hoy en día cada vez más se implementan en el mercado metodologías para el control microbiológico en el área de alimentos y se han publicado normas ISO como la 16140 que presenta un protocolo para validar métodos microbiológicos alternativos así como los estándares internacionales ISO/FDIS 22174:2005 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos generales y definiciones; ISO/TS 20836:2005. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Prueba de funcionamiento para termocicladores: ISO 20837:2006. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos para la preparación de la muestra para la detección cualitativa e ISO 20838:2006 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos para la amplificación y detección para métodos cualitativos, sin embargo se puede afirmar que aún no se ha alcanzado la armonización global.

Obviamente la validación es una necesidad prioritaria para fabricantes y podría decirse que una garantía y seguridad para el usuario pero la armonización global de la misma es sumamente necesaria.

A través del análisis de los estándares antes mencionados se abordará la problemática de la metrología del análisis microbiológico en alimentos mediante la determinación de microorganismos en alimentos por la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

PROBLEMÁTICA

Dado que las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan; se requiere obtener de manera oportuna y eficaz información sobre la presencia de estos microorganismos patógenos en los alimentos a través de técnicas estandarizadas que permitan implementar la vigilancia y control de dichos microorganismos.

Los métodos de ensayo microbiológico pueden ser de tipo cualitativo tales como en los que el resultado se expresa en términos de detectado/no detectado e incluye los procedimientos de confirmación e identificación y los de tipo cuantitativo que brindan información numérica de los resultados. En general se considera que los análisis microbiológicos incluyen pruebas de esterilidad, detección, aislamiento, recuento e identificación de microorganismos (virus, bacterias, hongos y protozoarios) y sus metabolitos en diferentes materiales y productos; o cualquier tipo de ensayo en el que se utilicen microorganismos como parte de un sistema de detección.

El control de la calidad microbiológica de los alimentos, hasta la fecha, estaba relegado al uso del método clásico de recuento en placa, sin embargo en rutina el uso de dicho método no permite garantizar siempre una buena calidad metrológica de los resultados ya que con frecuencia pueden producirse contaminaciones bacterianas o mutaciones no controladas que son fuente de importantes errores. Además de que se requieren de varios días a semanas antes de obtener resultados y de que las propiedades fenotípicas por las cuales las bacterias son identificadas no siempre pueden ser expresadas y cuando son expresadas puede ser difícil clasificarlas e interpretarlas.

Las normas NMX-EC-17025-IMNC-2006 (ISO/IEC 17025:2005) e ISO 10012:2003, exigen demostrar la seguridad del resultado de medir a través de cuestiones de tipo cuantitativo, sin embargo en pruebas microbiológicas cualitativas tan importantes en donde se declara la presencia o ausencia de un microorganismo patógeno como lo es la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es muy importante demostrar la seguridad de la determinación. EURACHEM propone para cumplir con esas características metrológicas cualitativas que piden las normas como la incertidumbre de la medición, estimarla sobre todo el equipo alrededor de la prueba, lo cual no resulta fácil por la misma naturaleza del ensayo.

La introducción de la técnica de PCR representa una valiosa alternativa para los métodos tradicionales de detección; velocidad, buen límite de detección, selectividad, especificidad, sensibilidad y potencial para la automatización son sus ventajas más importantes. Sin

embargo, para demostrar confiabilidad en los resultados de medir en laboratorios que usan esta técnica es muy difícil poder seguir los lineamientos que exige la normatividad.

La presente tesis tiene como objetivo comprobar que los requisitos técnicos que plantea la norma 17025 y el documento de aplicación son suficientes y pueden ser cumplidos por los ensayos microbiológicos cualitativos para asegurar la calidad de los resultados obtenidos; estableciendo de qué manera se pueden salvar las limitantes que se presentan por la propia naturaleza de la técnica.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

I.1. REQUISITOS GENERALES PARA LA COMPETENCIA DE LOS LABORATORIOS DE ENSAYO

La norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 (ISO/IEC 17025:2005) constituye la base para que los laboratorios de ensayo y calibración puedan demostrar que poseen un sistema de gestión, que son técnicamente competentes y que son capaces de generar resultados válidos. El capítulo 5 de la norma está conformado por los requisitos para la competencia técnica en los tipos de ensayos o calibraciones que el laboratorio lleva a cabo. Además, existen otros documentos nacionales e internacionales que proporcionan información específica sobre ciertos requisitos técnicos y la manera en que se les puede dar cumplimiento.

A continuación se abordan los requisitos técnicos que son la base de esta tesis; considerando que son muchos los factores que determinan la exactitud y la confiabilidad de los ensayos y calibraciones realizados por un laboratorio, entre los que se incluyen: factores humanos, instalaciones y condiciones ambientales, los métodos de ensayo y calibración, la validación de los métodos, el equipo, la trazabilidad de las mediciones y el muestreo, entre otros.

El laboratorio debe considerar estos factores al desarrollar los métodos y procedimientos de ensayo y de calibración, en la formación y calificación del personal, así como en la selección y la calibración de los equipos utilizados.

En cuanto a los requisitos relacionados al personal, la dirección del laboratorio debe asegurar la competencia de todos los que operen equipos o instrumentos de medición específicos, realicen los ensayos o calibraciones, evalúen los resultados y firmen los informes de los ensayos y los certificados de calibración. (Para mayor referencia consultar NMX-EC-17025-IMNC-2006, 5.2 Personal).

Respecto a las condiciones ambientales debe asegurarse que no invaliden los resultados ni comprometan la calidad requerida de las mediciones. Las instalaciones incluidas las fuentes de energía e iluminación deben facilitar la realización correcta de los ensayos o calibraciones.

Es conveniente que haya una separación entre las áreas en las que se realizan actividades incompatibles. Esto ayudará a prevenir la contaminación cruzada. (Para mayor referencia consultar NMX-EC-17025-IMNC-2006, 5.3 Instalaciones y condiciones ambientales).

En relación a la selección del método de ensayo (método analítico) y la validación del método resulta conveniente empezar por definir lo que es un método analítico, de acuerdo con la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México 2002, se define como la *“Descripción de la*

secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra". Los métodos analíticos se pueden clasificar en base a criterios como: su estado regulatorio, su aplicación, la naturaleza de la respuesta analítica, su propósito analítico y la naturaleza del sistema de medición. La Norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 establece que se deben utilizar preferentemente aquellos métodos publicados como normas internacionales, regionales o nacionales y pueden ser complementados con detalles adicionales para asegurar una aplicación coherente.

También se pueden utilizar métodos desarrollados o adoptados por el laboratorio y métodos no normalizados siempre y cuando sean apropiados para el uso previsto y han sido validados.

La validación de un método analítico es un requisito importante en la práctica del análisis químico. En la literatura técnica existe información relacionada a la validación de métodos especialmente en lo que concierne a métodos específicos. En algunos casos es vista como algo que solo puede hacerse en colaboración con otros laboratorios; la definición ISO de validación nos dice que es la *"Confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto"* (ISO 8402:1994) y se puede interpretar como el proceso de definir una necesidad analítica y confirmar que el método en cuestión tiene capacidades de desempeño consistentes con las que requiere la aplicación, está implícito que los estudios para determinar los parámetros de desempeño se realizan usando equipos dentro de especificaciones, que están trabajando correctamente y que están calibrados adecuadamente. La validación del método permite demostrar que el método es adecuado para su propósito". (Eurachem, The fitness for purpose of analytical methods, 1998). Se deben validar los métodos no normalizados, los diseñados o desarrollados y los métodos normalizados utilizados fuera del alcance previsto. De tal manera que la exactitud de los valores que se obtengan al emplear métodos validados responda a las necesidades de los clientes. (Para mayor referencia consultar NMX-EC-17025-IMNC-2006, 5.4 Métodos de ensayo y de calibración y validación de los métodos).

Si un método en proceso de desarrollo tendrá un amplio uso, quizá como un procedimiento de referencia publicado, entonces el estudio de colaboración, involucrando un grupo de laboratorios, es probablemente la forma más conveniente de llevar a cabo la validación; sin embargo, esto no es siempre una opción adecuada para los laboratorios. El laboratorio tiene que decidir cuáles de los parámetros de desempeño del método necesitan caracterizarse con el fin de validar el método.

Algunos de los parámetros de desempeño de un método que se deben evaluar de acuerdo con la Guía de EURACHEM para la validación de métodos y temas relacionados son:

- Confirmación de la identidad y la selectividad/especificidad: La confirmación de la identidad es cuando se establece que la señal producida en la etapa de medición o alguna otra propiedad medida, la cual se atribuye al analito se debe únicamente al analito y no a la presencia de algo química o físicamente similar o que surja como una coincidencia.

La selectividad y la especificidad son medidas que garantizan la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias. Estos parámetros se aplican a los análisis tanto cualitativos como cuantitativos. Se pueden determinar analizando una vez muestras y materiales de referencia mediante un método candidato y otros métodos independientes. También analizar muestras que contengan varias interferencias sospechadas en presencia del analito de interés.

- Límite de detección (LoD): Consiste en proporcionar un indicativo del nivel al cual la detección resulta problemática. Para este propósito la aproximación “blanco + 3s” (s desviación estándar de la muestra) será suficiente.
Para mediciones cualitativas hay posiblemente un umbral de concentración por debajo del cual la especificidad se vuelve poco confiable. Analizar blancos de muestra con adición del analito en una gama de niveles de concentración. A cada nivel de concentración será necesario medir aproximadamente 10 réplicas independientes de manera aleatoria.
- Límite de cuantificación (LoQ): Es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad. Analizar 10 blancos de muestra independientes medidos una vez cada uno, expresar LoQ como la concentración del analito correspondiente a los valores del blanco de muestra más: 5s, 6s o 10s (s desviación estándar de los blancos de muestra).
- Exactitud: Expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero (ISO 3534-1:2006) . Se estudia en dos componentes: veracidad y precisión.
La veracidad (de un método) es una expresión de qué tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) respecto del valor real. Normalmente se expresa en términos de sesgo. La precisión es una medida de qué tan cercanos están los resultados unos con respecto a los otros y por lo general se expresa mediante medidas como la desviación estándar la cual describe la dispersión de los resultados. Las medidas de precisión más comunes son la “repetibilidad” y la “reproducibilidad”. La repetibilidad es la clase de variabilidad que se espera entre resultados cuando una muestra se analiza por duplicado. Si la muestra se analiza por varios laboratorios para fines comparativos, entonces una medida de precisión más significativa a usarse es la reproducibilidad.
Puede ser que para algunos casos particulares sea más útil una medida intermedia de la precisión (precisión medida entre diferentes analistas en periodos de tiempo prolongados dentro de un solo laboratorio). Esto algunas veces se conoce como “precisión intermedia”. La precisión se determina por lo general en términos de la desviación estándar o la desviación estándar relativa. Para métodos cualitativos la precisión no puede determinarse de esta manera pero puede expresarse por medio de índices de verdadero y falso positivo (y negativo).

- Sensibilidad: Es efectivamente la pendiente de la curva de respuesta, es decir, el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito. La sensibilidad es un parámetro útil para calcular y usar en fórmulas de cuantificación.
- Robustez: Es una medida de la efectividad del método analítico, es decir, qué tan buen desempeño se mantiene aún sin una implementación perfecta. Consiste en aplicar variaciones deliberadas al método y estudiar el efecto resultante en el desempeño. Las pruebas de robustez se aplican normalmente para investigar su efecto sobre la precisión y la exactitud del método.

La Guía de Validación de Métodos Analíticos, 2002, editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México constituye también una herramienta de apoyo y establece los parámetros de desempeño a evaluar en materia de validación de métodos analíticos. Además, incluye los criterios de aceptación para cada parámetro de desempeño.

Después de haber seleccionado y validado el método de ensayo es necesario estimar la incertidumbre de la medición; en ocasiones la propia naturaleza del método no permite realizar el cálculo riguroso, metrológicamente y estadísticamente válido de la incertidumbre de medición. En estos casos al menos se debe tratar de identificar los componentes de la incertidumbre y hacer una estimación razonable, asegurándose de que la manera en la que se informa el resultado no de una impresión equivocada de la incertidumbre. (Para mayor referencia consultar NMX-EC-17025-IMNC-2006, 5.4.6 Estimación de la incertidumbre de la medición).

Los equipos e instrumentos de medición y su software utilizados en los ensayos deben permitir obtener la exactitud requerida y cumplir con las especificaciones concernientes a los ensayos. Los equipos e instrumentos de medición deben ser verificados o calibrados antes de su uso y deben protegerse contra ajustes que puedan invalidar los resultados. (Para mayor referencia consultar NMX-EC-17025-IMNC-2006, 5.5 Equipos).

La verificación de instrumentos de medición es el conjunto de actividades que permiten detectar la presencia o ausencia de un error atribuible en un instrumento utilizado dentro de un sistema de medición. No debe confundirse la verificación del instrumento con la calibración de instrumentos. La verificación consiste en ajustar el instrumento hasta confirmar su correcto desempeño mediante la comparación del valor teórico de una sustancia o material de referencia y el obtenido cuando esa misma sustancia o material de referencia se mide con el instrumento calibrado. (Comisión Interinstitucional de Buenas Práctica de Fabricación, cipam 2004).

La calibración es el conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones especificadas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medición material y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia. (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. 2002).

Se debe diseñar un programa de calibración de los equipos de tal manera que se pueda asegurar que las mediciones hechas sean trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI). Cuando la trazabilidad de las mediciones a las unidades del SI no sea posible o no sea pertinente, se deben exigir requisitos como materiales de referencia certificados, métodos acordados o normas consensuadas para la trazabilidad. (Para mayor referencia consultar NMX-EC-17025-IMNC-2006, 5.6 Trazabilidad de las mediciones).

Cuando se realizan actividades de muestreo deben hacerse de manera planeada y en base a procedimientos en donde se registren los datos y las operaciones relacionados con el muestreo. Los planes de muestreo deben estar basados en métodos estadísticos cuando sea posible. (Para mayor referencia consultar NMX-EC-17025-IMNC-2006, 5.7 Muestreo).

La manipulación de los ítems (elementos) de ensayo o calibración incluye el transporte, recepción, manipulación, protección, almacenamiento, conservación o disposición final. El laboratorio debe tener procedimientos e instalaciones apropiadas para evitar el deterioro, la pérdida o el daño del ítem de ensayo o calibración durante el almacenamiento, la manipulación y la preparación. (Para mayor referencia consultar NMX-EC-17025-IMNC-2006, 5.8 Manipulación de los ítems de ensayo o de calibración).

A través de procedimiento de control de calidad debe realizarse el seguimiento de la validez de los ensayos y las calibraciones. Los datos resultantes deben registrarse de tal manera que se detecten las tendencias y se puedan aplicar técnicas estadísticas para la revisión de los resultados. El seguimiento puede incluir elementos como: el uso regular de materiales de referencia, la participación en comparaciones interlaboratorios, la repetición de ensayos o calibraciones utilizando el mismo método o métodos diferentes, entre otros. (Para mayor referencia consultar NMX-EC-17025-IMNC-2006, 5.9 Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo y de calibración).

Finalmente los resultados de cada ensayo, calibración o serie de ensayos o calibraciones deben informarse de manera clara, exacta, sin ambigüedades y objetiva, de acuerdo con las instrucciones específicas de los métodos de ensayo o calibración, en un informe de ensayo o un certificado de calibración que incluya toda la información requerida por el cliente y necesaria para la interpretación de los resultados del ensayo o calibración, así como toda la información requerida por el método utilizado. (Para mayor referencia consultar NMX-EC-17025-IMNC-2006, 5.10 Informe de resultados).

I.2. EL LABORATORIO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS Y EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS

Un laboratorio de ensayos microbiológicos es una instalación que cuenta con la capacidad técnica, material y humana para efectuar las mediciones y análisis o determinar las características de materiales, productos o equipos de acuerdo a especificaciones establecidas. En cualquier momento del ensayo microbiológico se pueden cometer errores significativos y para prevenirlos es importante identificar los puntos críticos y controlarlos paso a paso a lo largo de todas las etapas del ensayo.

Dada la necesidad de asegurar la calidad del trabajo que realizan los laboratorios microbiológicos se han desarrollado normativas y recomendaciones que tienden a conseguir que los resultados obtenidos en estos laboratorios sean confiables y comparables entre sí. (Uruburu, 1999).

Análisis Microbiológico de los Alimentos

Por lo general las bacterias presentes en el medioambiente son beneficiosas para los organismos, animales y plantas, sin embargo algunas bacterias pueden ser la causa de importantes enfermedades infecciosas, de ahí la necesidad de controlar su presencia. El control de calidad microbiológico de los alimentos, hasta la fecha, estaba relegado al uso del método clásico de recuento en placa. Como alternativa, en los últimos años se han desarrollado diversos métodos de análisis basados en medidas instrumentales que permiten obtener resultados de mayor calidad metrológica y con un tiempo de análisis claramente inferior. En general estos métodos de análisis pueden dividirse en dos grandes grupos: métodos directos y métodos indirectos. Los métodos indirectos se basan en determinar la disminución o aumento de un compuesto debido al metabolismo bacteriano, en cambio los métodos directos se basan en efectuar una medida analítica directamente relacionada con el microorganismo.

Desde el punto de vista metrológico existen diversas guías orientadas hacia el análisis microbiológico, sin embargo, aún deben hacerse más esfuerzos para proponer protocolos de control de los análisis más seguros, así como metodologías más robustas y eficaces que permitan obtener resultados de forma rápida, segura e independiente. Actualmente se ha publicado la norma ISO 16140 que presenta un protocolo para validar métodos microbiológicos alternativos, sin embargo, podría afirmarse que aún no se ha alcanzado la armonización global. Así pues, se encuentran diferentes protocolos según se trate de la norma ISO o de AOAC Internacional. Obviamente la validación es una necesidad prioritaria y podría decirse que una garantía y seguridad para el usuario pero la armonización global de la misma es también sumamente necesaria. (Simonet, 2005).

I.3. DOCUMENTO DE APLICACIÓN EA-4/10 “ACCREDITATION FOR MICROBIOLOGICAL LABORATORIES”

Los laboratorios de análisis microbiológicos que deseen ser acreditados, deberán cumplir los requisitos generales establecidos en la norma ISO/IEC 17025:2005 y tener en cuenta las directrices contenidas en este documento de aplicación para los análisis microbiológicos según se establece en el Anexo B de la norma. Este documento ha sido elaborado conjuntamente por EURACHEM y EA para promover un enfoque armonizado para la acreditación de laboratorios.

Los análisis microbiológicos incluyen pruebas de esterilidad, detección, aislamiento, recuento e identificación de microorganismos (virus, bacterias, hongos y protozoos) y sus metabolitos en diferentes materiales y productos; o cualquier tipo de ensayo en el que se utilicen microorganismos como parte de un sistema de detección, así como la utilización de microorganismos para ensayos ecológicos. Este documento puede servir también de

orientación para los laboratorios que utilizan técnicas en áreas relacionadas con la microbiología, como bioquímica, biología molecular y cultivos celulares, aunque esos laboratorios pueden tener que cumplir otros requisitos adicionales.

Los análisis microbiológicos deben ser realizados o supervisados por personal calificado y con experiencia en el área de la microbiología (manejo de técnicas básicas como preparación de placas, recuento de colonias, técnicas asépticas, etc). En ocasiones es más apropiado relacionar la competencia con una técnica, instrumento o equipo de medición en particular, más que con métodos. (Para mayor referencia consultar EURACHEM/EA Guide 04/10, 2 Personnel).

Para reducir el riesgo de contaminación cruzada el laboratorio debe tener áreas separadas para realizar actividades como: recepción y almacenamiento, preparación, análisis de las muestras, mantenimiento de microorganismos de referencia, preparación de medios de cultivo y descontaminación, entre otras; y establecer un programa adecuado de vigilancia de las condiciones ambientales.

Además se debe establecer un programa documentado de limpieza para las instalaciones, instrumentos y equipos de medición y las superficies. El personal que realiza ensayos microbiológicos debe utilizar la indumentaria apropiada (en caso necesario, protector de cabello, barba, manos, pies, etc). El personal se despojará de dicha indumentaria antes de abandonar el área. Esto es especialmente importante en el laboratorio de biología molecular, donde, por ejemplo, el paso de un área con una elevada carga de ADN a otra con una baja carga de ADN puede producir sin querer contaminación cruzada. En muchos casos será suficiente con utilizar una bata de laboratorio. (Para mayor referencia consultar EURACHEM/EA Guide 04/10, 3 Environment).

La validación de los métodos de ensayo microbiológico debe reflejar las condiciones reales del ensayo ya sea utilizando productos contaminados naturalmente o inoculados con un nivel conocido de microorganismos contaminantes; es necesario realizar paralela y simultáneamente muestras sin inocular a fin de determinar posibles contaminaciones ambientales.

Los métodos de ensayo microbiológicos cualitativos, tales como en los que el resultado se expresa en términos de detectado /no detectado y los procedimientos de confirmación e identificación, deben ser validados estimando, cuando sea apropiado, su especificidad, exactitud relativa, desviación positiva, desviación negativa, límite de detección, efecto matricial, repetibilidad y reproducibilidad. En el caso de los ensayos microbiológicos cuantitativos, debe considerarse la especificidad, sensibilidad, exactitud relativa, desviación positiva, desviación negativa, repetibilidad, reproducibilidad y el límite de cuantificación dentro de una variabilidad establecida y, en caso necesario, determinar cuantitativamente estos parámetros. Las diferencias debidas a las matrices deben tenerse en cuenta al analizar diferentes tipos de muestras. Los resultados deben evaluarse utilizando métodos estadísticos apropiados. (Para mayor referencia consultar EURACHEM/EA Guide 04/10, 4 Validation of test methods).

A continuación se señalan algunas definiciones referentes a la validación de métodos adaptadas al análisis microbiológico:

Material de referencia certificado: Material de referencia, acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades han sido certificados mediante un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de dichas propiedades. Cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre y el nivel de confianza correspondiente.

Límite de detección: Aplicado a los análisis microbiológicos cualitativos – Número mínimo de microorganismos que pueden ser detectados, pero en cantidades que no pueden estimarse con precisión.

Desviación negativa: Ocurre cuando el método alternativo da un resultado negativo sin confirmación y el método de referencia da un resultado positivo. Esta desviación se convierte en un resultado falso negativo cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es positivo.

Desviación positiva: Ocurre cuando el método alternativo da un resultado positivo sin confirmación y el método de referencia da un resultado negativo. Esta desviación se convierte en un resultado falso positivo cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es negativo.

Cultivos de referencia: Término colectivo que se refiere a cepas de referencia, cepas de reserva y cultivos de trabajo.

Cepas de referencia: Microorganismos definidos por lo menos al nivel de género y especie, catalogados y descritos según sus características y preferiblemente de origen conocido. Normalmente obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida.

Material de referencia: Material o sustancia cuyas propiedades tienen uno o más valores suficientemente homogéneos y claramente establecidos como para poder ser utilizados en la calibración de un aparato, la evaluación de un método de medida o la asignación de valores materiales.

Método de referencia: Método investigado a fondo, que describe con claridad y exactitud las condiciones y los procedimientos necesarios para medir los valores de una o más propiedades y que ha demostrado tener una exactitud y una precisión apropiadas para el uso que pretende hacerse del mismo, de manera que puede utilizarse para evaluar la exactitud de otros métodos empleados para realizar la misma medición y en particular para caracterizar un material de referencia. En general se trata de un método normalizado nacional o internacional.

Cepas de reserva: Cepas idénticas obtenidas mediante un único subcultivo de una cepa de referencia.

Exactitud relativa: Grado de concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando un método de referencia reconocido.

Sensibilidad: Fracción del número total de cultivos o colonias positivos que son asignados correctamente con el método utilizado.

Especificidad: Fracción del número total de cultivos o colonias negativos que son asignados correctamente con el método utilizado.

Cultivo de trabajo: Subcultivo primario obtenido de una cepa de reserva.

Los ensayos microbiológicos no permiten realizar un cálculo riguroso metrológica y estadísticamente válido de la incertidumbre de medida; la estimación de ésta puede basarse en datos sobre repetibilidad y reproducibilidad exclusivamente, aunque lo ideal es incluir los sesgos.

Deben identificarse los distintos componentes individuales de la incertidumbre y demostrar que están bajo control y evaluar su contribución a la variabilidad de los resultados. Algunos componentes (como los efectos del pipeteado, el pesado y las diluciones) pueden medirse directamente y evaluarse para demostrar que realizan una contribución insignificante a la incertidumbre global. (Para mayor referencia consultar EURACHEM/EA Guide 04/10, 5 Uncertainty of measurement).

Como parte de su sistema de calidad el laboratorio debe implantar y documentar un programa de mantenimiento, calibración y verificación del funcionamiento de sus instrumentos y equipos de medición fundamentales para el ensayo. El mantenimiento debe realizarse a los intervalos especificados dependiendo de factores como la frecuencia de uso. La frecuencia de las calibraciones y verificaciones se establecerá en función de la experiencia documentada y dependerán del uso, tipo y funcionamiento previo de los instrumentos y equipos. Las calibraciones deben ser trazables a patrones nacionales o internacionales. (Para mayor referencia consultar EURACHEM/EA Guide 04/10, 6 Equipment- maintenance, calibration and performance verification).

Al inicio y durante su periodo de validez debe verificarse la idoneidad de cada uno de los lotes de reactivos críticos para el ensayo utilizando microorganismos de control positivo y negativo que sean trazables a colecciones de cultivos nacionales o internacionales reconocidas. También debe verificarse que los medios de cultivo, diluyentes y otras suspensiones preparadas internamente tengan las características adecuadas con respecto a: recuperación o supervivencia de los microorganismos de interés, inhibición o supresión de los microorganismos no deseados, propiedades bioquímicas (diferenciales y diagnósticas), propiedades físicas (por ejemplo pH, volumen y esterilidad). Los medios, diluyentes y suspensiones que se suministren en forma directamente o parcialmente utilizable deben ser validados antes de su utilización. (Para mayor referencia consultar EURACHEM/EA Guide 04/10, 7 Reagents and culture media).

Los materiales de referencia y los materiales de referencia certificados proporcionan la trazabilidad esencial en las mediciones y son utilizados, por ejemplo, para:

- Demostrar la exactitud de los resultados
- Calibrar equipos o aparatos
- Controlar la calidad del laboratorio
- Validar métodos de medición y
- Permitir la comparación de métodos (intercomparación)

En el área de la microbiología se utilizan para: Demostrar la sensibilidad de medios de cultivo, llevar a cabo controles ambientales y evaluar los procesos de esterilización, entre

otros. Deben reunir características como: ser estables, homogéneos, tener valores asignados a algunas de sus propiedades y presentar las incertidumbres asignadas a esos valores.

Para seleccionar un material de referencia se debe tener en cuenta el propósito al cuál será destinado.(Pérez, 2001).

El cultivo de un microorganismo que se vaya a utilizar como inóculo en una validación debe proceder de una cepa que no haya sido subcultivada más de 5 veces desde la cepa de referencia original. Un subcultivo se define como la resiembra del microorganismo a partir de un cultivo a medio fresco estéril. En el caso de microorganismos que se conservan congelados cada ciclo de congelación, descongelación y reactivación se considera un subcultivo. (Para mayor referencia consultar EURACHEM/EA Guide 04/10, 8 Reference materials and reference cultures).

Finalmente para supervisar la validez de los ensayos y/o calibraciones se deben incluir algunos controles internos como: el uso de muestras inoculadas, recuentos cruzados entre analistas, uso de réplicas y el uso de materiales de referencia y controles externos como la participación regular en ensayos de aptitud, dando preferencia a los programas de ensayos de aptitud que utilicen matrices apropiadas. (Para mayor referencia consultar EURACHEM/EA Guide 04/10, 12 Quality assurance of results/quality control of performance).

I.4. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA) Y LOS MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Sus síntomas más comunes son diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etc.

Hasta la fecha se han descrito más de 250 ETA. La mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, virus y parásitos. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA se encuentran especies de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella*, así como la cepa O157:H7 de la enterobacteria *Escherichia coli*. (González, 2005).

Las ETA constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan. La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos y se ha demostrado que la contaminación de éstos puede ocurrir durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada, pues algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la flora normal de aves, cerdos y ganado.

El control de los microorganismos causantes de ETA, por parte tanto de las autoridades sanitarias como de las plantas procesadoras de alimentos, depende en cierta medida del método analítico que se utiliza para su detección.

La detección y la investigación de los brotes de ETA constituye uno de los principales retos para el Sistema de Salud Pública, pues requiere obtener, de manera oportuna y eficaz información médica (datos personales, síntomas, etc.) y análisis de laboratorio de los restos de alimentos o de las materias primas empleadas en su elaboración e incluso, de las manos de las personas involucradas en la manipulación del alimento. (González, 2005).

Un alto porcentaje de los casos de ETA no puede asociarse con algún alimento en particular o no es factible identificar al patógeno responsable, debido, fundamentalmente, a que los resultados de los análisis bacteriológicos demoran; asimismo, el vehículo alimentario implicado ya no se encuentra disponible para su análisis, lo que sugiere la necesidad de establecer métodos rápidos y eficientes de detección del agente causal.

Dada la gran importancia de los microorganismos para el ser humano, se han desarrollado una serie de metodologías para poder diferenciar un microorganismo de otro. Estas metodologías se han basado tradicionalmente en la observación de los síntomas que presentan los hospederos, en la observación macro o microscópica del microorganismo o bien de las estructuras reproductivas de los microorganismos, del desarrollo del patógeno en un medio de cultivo específico, de la tinción producida al aplicar algunos colorantes sobre el tejido infectado o bien, sobre el patógeno y la reacción de un anticuerpo a la presencia de un patógeno. (Rodríguez, et. al. 2009).

La identificación de un microorganismo (patógeno) basado en la sintomatología presenta varias desventajas como por ejemplo, los síntomas son muy variados y numerosos; dependen del hospedero del patógeno e incluso, de los factores del medio ambiente en el que se desarrolla el proceso patológico. Por tales motivos puede dar origen a errores graves en el diagnóstico de una enfermedad.

La detección de un microorganismo basada en la observación macro o microscópica es más eficiente que la identificación basada solo en los síntomas. La observación a nivel macro o microscópico es un procedimiento simple, es una detección directa de patógenos y puede diferenciar organismos distintos morfológicamente. Presenta las siguientes desventajas: Es un procedimiento lento, laborioso y tedioso dado que se tiene que aislar el microorganismo (lo cual no en todos los casos es posible) y desarrollarlo en un medio de cultivo hasta que se alcance una etapa de crecimiento adecuada para su identificación. La identificación en forma microscópica solo es posible en casos muy específicos, es de baja sensibilidad y se requiere contar con equipo muy especializado en el caso de algunos microorganismos. La estructura de un microorganismo puede cambiar debido a la influencia del medio ambiente y se requiere de una gran experiencia para poder diferenciar una especie de otra a nivel microscópico. (Rodríguez, et.al. 2009).

La identificación de patógenos por medio de técnica de Gram, pruebas bioquímicas o del desarrollo del patógeno en un medio de cultivo específico pueden detectar un amplio rango de variantes, no requieren de equipo muy sofisticado, son pruebas fáciles de

realizar; sin embargo, presenta las desventajas de que el tiempo para identificar un microorganismo puede ser muy largo (en algunos casos hasta de 25 días), además se requieren un gran número de pruebas para estar seguro de la identificación del patógeno (una sola prueba no es suficiente en la mayoría de los casos); por usarse diferentes pruebas, se utiliza una amplia gama de reactivos, lo cual incrementa el costo de la prueba significativamente. Por otro lado, se ha demostrado que algunas células bacterianas pueden entrar en un estado viable pero no cultivable (VPNC), debido al procesamiento al que se sujeta el alimento, lo que imposibilita el uso de los métodos de cultivo como herramienta de diagnóstico.

El uso de anticuerpos para la identificación de microorganismos se ha empleado por ser una técnica simple y rápida. Se puede automatizar y puede ser usada para trabajar con varias muestras al mismo tiempo. Sin embargo la detección no puede ser precisa cuando existen cantidades mínimas de microorganismos, en el caso de patógenos no distingue entre infecciones activas y latentes. Además, carece de anticuerpos y antígenos para muchos microorganismos y en algunos casos la detección no es precisa por la nula especificidad de algunos anticuerpos. Otras desventajas son que los anticuerpos tienen un costo muy elevado o bien en algunos casos pueden ofrecer falsos positivos. (Rodríguez, et.al. 2009).

Las técnicas moleculares para la identificación de microorganismos se basan en el análisis de los ácidos nucleicos extraídos de los microorganismos en forma directa o bien de una muestra conteniendo el microorganismo en cuestión. En la actualidad estas técnicas están teniendo un auge muy importante debido a su: especificidad (pueden detectar solo la molécula o microorganismo de interés), sensibilidad (son capaces de detectar la presencia de un solo microorganismo), rapidez (se puede identificar un microorganismo en menos de 24 horas) y pueden ser automatizadas (permiten tener un diagnóstico en un menor tiempo y reducir los costos). El uso de técnicas moleculares ha permitido identificar nuevos microorganismos, de los cuales no había sido posible su cultivo e identificación por técnicas tradicionales; además, permiten estudiar las poblaciones microbianas sin hacer aislamientos, por lo tanto se evitan los sesgos que pueden surgir con el cultivo de microorganismos. Así mismo, estas técnicas permiten la detección de microorganismos altamente patógenos, los cuales pueden ser identificados muertos evitando así los riesgos de infección del analista. Las técnicas moleculares han demostrado ser muy útiles en situaciones clínicas donde los métodos convencionales presentan poca sensibilidad, son muy lentos o muy complicados para ser usados a gran escala. Otra aplicación importante es en el monitoreo del surgimiento de mutaciones en el genoma.

Algunas de las desventajas asociadas a las técnicas moleculares son: por lo general no distinguen entre organismos vivos y muertos, aunque algunas veces esto no es precisamente una desventaja, se tiene que contar con conocimientos de secuencias de nucleótidos específicas del patógeno a diagnosticar, se requiere de personal altamente capacitado para el desarrollo de las pruebas de identificación, se requiere equipo más específico para el diagnóstico lo cual eleva la inversión inicial y se desarrollan procedimientos con múltiples etapas lo que incrementa la posibilidad de errores, además

de la posibilidad de obtener falsos positivos y falsos negativos. El alto costo de las técnicas moleculares tenderá a bajar a medida que se incremente el uso de estas técnicas; por otra parte, el problema de falsos positivos y negativos se puede solucionar si se incluye en cada análisis un testigo positivo y uno negativo. (Rodríguez, et.al. 2009).

Se han propuesto una gran variedad de técnicas moleculares para la detección de microorganismos, describir cada una de las técnicas propuestas escapa del alcance de esta tesis por lo que solo se mencionarán las más usadas comercialmente haciendo énfasis en la que es de interés para este trabajo de investigación. La mayoría de las técnicas moleculares se basan en la hibridación de los ácidos nucleicos o bien en la reacción en cadena de la polimerasa.

- a) Técnicas basadas en hibridación de ADN: estas técnicas se desarrollaron a partir del conocimiento de que dos cadenas sencillas de ácido nucleico que tengan secuencias complementarias se pueden unir o hibridar para formar una cadena doble. Las cadenas sencillas pueden ser de ADN o ARN, o bien una de ADN y otra de ARN. Dentro de estas técnicas de hibridación más utilizadas están los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP's); transferencia por aplastado (squash blot) y ARN de cadena doble.
- b) Técnicas basadas en PCR: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la amplificación enzimática in vitro de un segmento de ADN específico del microorganismo blanco. Incluyen: RT-PCR (amplificación de un segmento de ADN previamente formado a partir de ARN); PCR anidada (amplificación enzimática de un segmento de ADN interno de otro segmento de ADN previamente amplificado); RAPDs o polimorfismo del ADN amplificado al azar; Inmuno-PCR (unión de un microorganismo a un soporte sólido utilizando un anticuerpo y una posterior amplificación de ADN por PCR); PCR- Inmunomagnético (similar a la anterior, en este caso el soporte es una esfera magnética, la cual es removida de la muestra con un magneto y posteriormente se realiza la PCR); PCR-múltiple (permite la detección de diferentes moléculas o microorganismos de interés en una sola reacción); entre otras técnicas. La flexibilidad, automatización, rapidez y confiabilidad de las técnicas moleculares basadas en PCR son las técnicas moleculares con más aceptación en la actualidad para la detección de microorganismos en general. (Rodríguez, et.al. 2009)

La introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en diagnósticos microbianos se ha establecido en laboratorios de investigación como una valiosa alternativa para los métodos tradicionales de detección. Rapidez y buen límite de detección, selectividad, especificidad, sensibilidad y potencial para la automatización son en general sus ventajas más importantes. El éxito en la implementación de la PCR para la identificación de microorganismos causantes de ETA depende entre otros factores de la elección correcta de la secuencia blanco, la cual debe permitir la identificación del microorganismo de interés, independientemente de la presencia de otras fuentes de ADN procedente de microorganismos concomitantes o de la muestra misma. (Malorny, et.al. 2003 a).

Las regiones genómicas más comúnmente empleadas en el diseño de cebadores para la identificación de microorganismos patógenos son las relacionadas con los genes que codifican para toxinas y proteínas antigénicas específicas.

En la práctica, cuando se aplican las técnicas de PCR al análisis de ácidos nucleicos en matrices complejas como los alimentos, la eficiencia de la amplificación puede reducirse significativamente por la presencia de sustancias inhibidoras como la hemoglobina, la lactoferrina, los polisacáridos, las grasas o las proteínas. La repercusión de estos compuestos en la obtención de resultados falso-negativos puede eliminarse empleando pasos de pre enriquecimiento o polimerasas apropiadas, así como membranas selectivas. (González, 2005)

I.5. LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En 1983 Kary Mullis desarrolló una nueva técnica que hizo posible la síntesis de grandes cantidades de un fragmento de ADN sin tener que clonarlo: la reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés). Esta técnica es considerada la más revolucionaria del último cuarto del siglo XX. Con ésta se consigue copiar millones de veces, en un par de horas, una secuencia predeterminada, dentro de una mezcla de ADN tan compleja como el propio genoma humano, donde la secuencia de interés representa tan sólo una diezmillonésima parte. (Rodríguez, 2004)

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN en el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla) que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de ciclos repetidos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas, millones de copias de la secuencia deseada del ADN.

Al principio, su inventor enfrentó dos problemas fundamentales: uno era que en cada ciclo había que añadir la enzima ADN polimerasa, ya que ésta se inactivaba con las temperaturas tan altas demandadas para desnaturalizar el ADN y exponer las bases nitrogenadas de sus nucleótidos. Otro inconveniente era que había que hacerlo manualmente en tres baños mantenidos a las diferentes temperaturas requeridas, pasando rápidamente la muestra de un baño al otro y luego al último, repitiendo esto varias decenas de veces. (Rodríguez, 2004)

El descubrimiento de una bacteria (*Thermus aquaticus*) que vive en aguas termales junto a geiseres a 75°C, la cual tiene una ADN polimerasa que funcionaba bien a altas temperaturas (72°C) e incluso es estable a 94°C, representó un gran avance, ya que sólo tenía que ser añadida al principio y se mantenía activa durante todo el proceso. Esto, junto con el diseño de los termocicladores o aparatos que consisten en un bloque que puede ser programado para calentarse y enfriarse rápidamente en determinados tiempos, condujo a la automatización total del proceso.

La reacción consta, por lo regular, de una treintena de ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos: el primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo, el cual se realiza a una temperatura de alrededor de 95°C por un

minuto. Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco. En el segundo paso ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores, a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADNs. Esta temperatura depende de la temperatura de fusión (T_m) de los iniciadores, que generalmente oscila entre 50 y 60°C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde. (Rodríguez, 2004)

Para realizar una PCR se necesita mezclar en un tubo el ADN que contiene la secuencia a amplificar, ambos cebadores que se alinearán a las cadenas simples del ADN, la mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) en cantidades suficientes, la solución amortiguadora de reacción para la polimerasa, agua grado biología molecular libre de pirógenos y de nucleasas para completar el volumen final de reacción (que normalmente oscila entre 20 y 100 μ l) y como ingrediente final crucial para la reacción, la enzima ADN polimerasa termoestable.

Solución amortiguadora: La solución amortiguadora para la reacción se emplea, comúnmente, concentrada diez veces y por lo general incluye Tris-HCl (pH= 8.4 a temperatura ambiente), KCl y $MgCl_2$.

Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes, los cuales en la práctica aumentan la especificidad y fidelidad de la reacción, tales como el dimetilsulfóxido (DMSO) añadido para disminuir la estructura secundaria del ADN, detergentes como el tween 20 o el Tritón X-100, que ayudan a estabilizar la enzima y finalmente el polietilenglicol de elevado peso molecular (PEG 8000, 6000, entre otros), el glicerol, la formamida o la seroalbúmina bovina, entre otros; aunque en ningún caso estos últimos son imprescindibles.

Magnesio: Tanto el ión magnesio como el manganeso tienen una función crítica en la reacción, ya que son cofactores de la ADN polimerasa, requiriéndose a una concentración que oscila regularmente entre 0.5 y 2.5 mM. La concentración de $MgCl_2$ debe optimizarse para cada ensayo en particular, ya que puede tener efecto tanto en la especificidad como en el rendimiento de la reacción. En general, concentraciones insuficientes de Mg^{+2} dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas.

Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs): Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP; distinguibles por sus bases nitrogenadas) son los ladrillos con los que se construyen las nuevas cadenas de ADN.

La variación en su concentración afecta la especificidad y fidelidad de la reacción. Concentraciones altas de los mismos hacen disminuir la fidelidad con la que la polimerasa efectúa su trabajo e incluso pueden llegar a inhibir su actividad. También afecta a la fidelidad de la reacción el uso de concentraciones desbalanceadas de estos cuatro ingredientes, siendo las concentraciones usuales, en la mayoría de los casos, entre 0.2 a 1 mM.

Los dNTPs pueden captar iones de magnesio por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación, aconsejándose que la concentración de Mg^{+2} sea 0.5 a 1 mM superior a la concentración de los dNTPs.

Cebadores o iniciadores: Éstos son el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo de PCR. Su longitud suele estar entre 18 y 30 nucleótidos y su contenido en G+C entre 40-75%. La concentración a la que suelen emplearse en una PCR está en el intervalo de 0.1-0.5 μ M. Los iniciadores normalmente se diseñan para ser exactamente complementarios a las secuencias que flanquean el segmento del molde de ADN que se desea amplificar.

Los cebadores ideales deben carecer lo más posible de estructuras secundarias, así como de complementariedad entre sí. La complementariedad en el extremo 3' induce a que ambos iniciadores se traslapen en dicho extremo y sirvan de templados y a su vez de iniciadores entre sí, para que la polimerasa los extienda y genere así pequeños amplicones (conjuntos de moléculas de ADN idénticas que resultan de una reacción de PCR) referidos como dímeros de cebadores. Estos dímeros son productos cortos que se amplifican de manera eficiente, reduciendo la cantidad de cebadores disponibles en la reacción y provocando un menor rendimiento del amplicón de interés.

Ambos iniciadores deben tener una temperatura de fusión o T_m similar y por ende, un contenido semejante en G+C. La fórmula más utilizada para calcular la T_m de un iniciador es: $T_m = (2^\circ\text{C}) (\# \text{ de A+T}) + (4^\circ\text{C}) (\# \text{ de G+C})$.

La distancia que separa los sitios donde se aparean los cebadores dentro del ADN molde determina el tamaño del producto de amplificación. El tamaño ideal depende de la aplicación: los productos largos se amplifican con menor eficiencia, mientras que los productos muy cortos pueden confundirse con dímeros de los iniciadores y limitan mucho la posibilidad de caracterizarlos posteriormente.

Existen diferentes programas computacionales que ayudan en el diseño de cebadores y calculan sus T_m s, estructuras secundarias y posibles interacciones entre ellos.

Los cebadores se sintetizan en el laboratorio mediante un proceso escalonado en el que se van añadiendo nucleótidos libres al extremo de la cadena en crecimiento. El extremo 3' del nucleótido iniciador de la futura cadena se fija a un soporte sólido como una partícula de gel de sílice. Un sintetizador de ADN realiza la síntesis en fase sólida, añadiendo paso a paso cada nucleótido en una serie de etapas. Al final de cada ciclo de adición, la cadena en crecimiento se separa de la mezcla de reacción mediante filtración o centrifugación. A continuación se repite el procedimiento para unir otro nucleótido. Se invierten aproximadamente 40 minutos en añadir un nucleótido a la cadena y es posible sintetizar cadenas con una longitud de hasta 100 nucleótidos. (Rodríguez, 2004)

Diseño de los cebadores: Deben evitarse tramos largos de una sola base y que el extremo 3' tenga una estructura secundaria importante. También se debe procurar en lo posible que las últimas bases del extremo sean G o C, para que le brinden mayor estabilidad al punto de inicio de la etapa de extensión.

Normalmente deben tener un tamaño de 18-30 nucleótidos y que éste sea similar para ambos cebadores. La temperatura de hibridación de los cebadores al molde se ajusta para que sea, cuando mucho 5°C menor que la temperatura calculada según la fórmula arriba citada.

Enzima: Sólo pueden utilizarse polimerasas que sean capaces de actuar a las altas temperaturas empleadas en la reacción. En la actualidad la mayoría de las polimerasas que se suministran comercialmente son versiones recombinantes e incluso mejoradas por ingeniería genética.

Las enzimas ADN polimerasas comúnmente utilizadas son la ADN polimerasa Taq, proveniente de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* y la Vent de la bacteria *Thermococcus litoralis*. Sus temperaturas óptimas de catálisis oscilan alrededor de los 72°C, temperatura a la cual incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, siendo estables a altas temperaturas, incluso por encima de los 92°C.

De las dos enzimas señaladas, la popularidad alcanzada por la Taq rebasa por mucho y en diferentes aspectos a otras polimerasas. Esta enzima es una proteína que consta de una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de aproximadamente 95 kDa, cuenta con actividad de exonucleasa 5' → 3'. Y su fidelidad de replicación depende de la concentración del ión Mg^{+2} y de los dNTPs, así como del que exista o no balance en la concentración de estos últimos.

Existen otras enzimas que se usan también aparte de la Taq y la Vent, en donde se requiere actividad correctora para mayor fidelidad de copiado, como la Pfu, extraída originalmente de *Pyrococcus furiosus* o la UITma, proveniente de *Thermotoga maritima*, la cual también tiene actividad de transcriptasa reversa, lo que les permite catalizar tanto una transcripción reversa (conversión de ARN a ADN), como la propia PCR, como es el caso de la enzima *Thermus thermophilus*, ya fabricada por ingeniería genética y simplemente conocida como rTth. (Rodríguez, 2004)

ADN: La cantidad de ADN molde puede ser de tan sólo 1 ng en el caso de material genético clonado (en virus o plásmidos), o de un mínimo de 20 ng, cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas. De hecho, como se ha mencionado arriba, el molde puede ser también ARN el cual debe ser previamente transformado a ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa. Hay muchas formas posibles de preparar el molde para PCR.

En general, no es necesario purificar el molde, porque la reacción puede tolerar la presencia de impurezas, pero hay que tener mucho cuidado de eliminar, lo más posible, la presencia de inhibidores de la polimerasa, sobre todo en las muestras clínicas. Si el material son suspensiones celulares, puede ser suficiente con romper las células por calor.

Agua: El agua se usa como solvente del resto de los ingredientes y se requiere agua grado biología molecular.

Etapas de un Ciclo de Reacción

Tres son los pasos a seguir y a repetir por cada ciclo de la PCR. A éstos comúnmente se les refiere como desnaturalización, alineamiento y extensión.

Desnaturalización

El sustrato de la enzima de la PCR es el ADN de simple cadena que actúa como molde para la síntesis de su nueva cadena complementaria. Mediante un calentamiento a 94°C, el ADN de doble cadena logra que sus cadenas se separen o desnaturalicen.

Ésta es una etapa crítica, ya que es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente, lo que se consigue a temperaturas de 94°C, durante por lo menos un minuto. Si la muestra tiene alto contenido de G+C, se recomienda aumentar de preferencia el tiempo.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la actividad de la enzima decrece de manera muy rápida a partir de los 95°C= 40 min. y a 97.5°C = 5 min.), por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación. En la práctica se suele empezar con un período de desnaturalización prolongado (cinco minutos a 94°C), para asegurarse que la desnaturalización se lleve a cabo a lo largo de toda la molécula del ADN. (Rodríguez, 2004)

Alineamiento

La enzima, como todas las ADN polimerasas, necesita del grupo OH⁻ libre en el extremo 3' del iniciador ya apareado al sitio blanco de la amplificación, a partir de donde iniciar la síntesis. Este punto constituye el sitio de crecimiento de la cadena complementaria al molde.

Mientras que un cebador (referido como el 5) es complementario a la secuencia del extremo 5' de la región del ADN molde a amplificar, el otro es al extremo 3' de la misma, pero en la cadena opuesta.

El alineamiento específico de ambos cebadores se produce a una temperatura determinada por composición de bases y oscila entre 40 y 72°C. Ambas cadenas originales del ADN sirven simultáneamente como moldes para sintetizar sus respectivas cadenas complementarias nuevas.

Un aumento de temperatura favorece la especificidad, ya que disminuye las uniones incorrectas de los cebadores con sitios apócrifos del ADN molde. (Rodríguez, 2004)

Extensión

Con el ADN molde de cadena sencilla, excepto en los sitios donde los iniciadores se aparean, la polimerasa empieza a copiar la hebra, incorporando desoxirribonucleótidos trifosfatados en dirección 5' → 3'. Esta etapa debe realizarse a una temperatura alta, que es la que coincide con la máxima actividad de la polimerasa (72°C) para evitar alineamientos inespecíficos de los iniciadores.

El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación, debiendo estimar 1 min. para alargar 1000 nucleótidos. Es común que al finalizar todos los ciclos se realice un

último alargamiento por 5 min. a 72°C, para asegurarse que todos los productos de amplificación estén completamente terminados y tengan, por ende, exactamente la misma longitud. (Rodríguez, 2004)

Naturaleza Exponencial de los Ciclos

Al final del primer ciclo, ambas hebras de una molécula bicatenaria de ADN a las que se les hayan apareado los iniciadores han sido copiadas para generar dos nuevas cadenas bicatenarias.

Cuando se repite por segunda ocasión el ciclo de tres pasos, las dos moléculas del primer ciclo se copian para producir ahora cuatro moléculas. El tercer ciclo genera ocho moléculas.

En teoría, 20 ciclos producirán aproximadamente un millón de copias de la molécula molde de ADN y 30 ciclos generarán alrededor de mil millones de copias de ésta.

Pero en la práctica, el proceso no es tan eficiente. El número de ciclos que se utiliza adquiere gran relevancia a la hora de optimizar una PCR. Este número depende de la cantidad de ADN que existe en la muestra una vez que el resto de factores han sido optimizados (normalmente de manera empírica).

Es importante evitar un número alto de ciclos, ya que puede dar lugar a la amplificación de productos no deseados originados por hibridaciones inespecíficas.

Hay que tener en cuenta que la enzima sufre el efecto meseta que describe la atenuación en la tasa de la acumulación del producto, reflejándose esto en que después de un número determinado de ciclos la amplificación deja de comportarse de manera exponencial, volviéndose aritmética y finalmente llega a una fase estacionaria. Afortunadamente, cuando el efecto meseta se presenta, la cantidad de ADN sintetizado es suficiente para su posterior utilización. (Rodríguez, 2004)

Evolución de la Técnica

La tecnología de la PCR está experimentando continuas mejoras; un claro ejemplo de la sofisticación de esta reacción es su versión en “tiempo real”, que permite cuantificar con una alta confiabilidad la concentración de hasta múltiples substratos presentes de una reacción, en virtud de que cada cadena copiada genera una señal fluorescente de longitud de onda distinta que es medida el instante por el mismo termociclador de tiempo real.

Aplicaciones

Las aplicaciones de la PCR son múltiples, abarcando desde la evolución hasta la clínica, pasando por la genética, la biología molecular y la biotecnología; amén de aplicaciones en la agricultura y la ganadería.

En microbiología, la PCR permite identificar al agente infeccioso independientemente de su respuesta serológica, lo que representa una gran ventaja en casos donde los anticuerpos aparecen luego de un largo período de infección y a veces en forma impredecible.

HIPÓTESIS

Si se aplican los requisitos técnicos de la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 (ISO/IEC 17025:2005) en el ensayo microbiológico cualitativo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se obtendrá un plan integral de implementación de un esquema que permita asegurar la calidad de los resultados en este tipo de ensayos.

OBJETIVO GENERAL

Realizar un análisis de la norma ISO/IEC- 17025:2005 y del documento de aplicación EA-4/10 para abordar la problemática de la metrología del análisis microbiológico cualitativo de alimentos y comprobar que se puede dar cumplimiento a los requisitos técnicos planteados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Proponer el camino para dar cumplimiento a los requisitos técnicos que marca la norma ISO/IEC- 17025:2005 a partir de un ensayo microbiológico de tipo cualitativo como lo es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de patógenos transmitidos por alimentos.
- Realizar una revisión bibliográfica de los documentos ISO disponibles con respecto a la técnica de PCR para la detección de patógenos transmitidos por alimentos (Proyecto Food PCR).
- Proponer una alternativa para la validación de un ensayo de PCR y para lograr trazabilidad en este tipo de ensayos.
- Ofrecer una propuesta para la determinación de la incertidumbre de un ensayo de PCR.

CAPÍTULO II

REQUISITOS TÉCNICOS DE LA NORMA ISO/IEC 17025:2005 Y LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS

A continuación se presentan las recomendaciones para dar cumplimiento a los requisitos técnicos de la norma 17025 y del documento de aplicación EA-4/10 cuando se llevan a cabo ensayos microbiológicos de tipo cualitativo como lo es la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de patógenos transmitidos por alimentos a través de la revisión bibliográfica de los estándares ISO que se originaron a partir del proyecto Food-PCR para la estandarización de la metodología, que se llevó a cabo en varios laboratorios europeos, entre otros documentos que se revisaron.

II.1. REQUISITOS TÉCNICOS (5)

II.1.1. Generalidades (5.1)

Principio del método.

El análisis cualitativo consiste en la investigación y/o detección específica de secuencias objetivo de ácidos nucleicos en las muestras de prueba. La especificidad puede ser al nivel de género, especie, tipo o cepa del patógeno en el alimento.

Un resultado cualitativo debe demostrar claramente la presencia o ausencia de la secuencia objetivo bajo estudio, relativo a los controles apropiados y dentro de los límites de detección del método analítico usado y la porción de muestra analizada. (ISO 20838:2006).

El análisis comprende las siguientes etapas consecutivas:

- a) Enriquecimiento microbiano preliminar del patógeno del alimento en el material de prueba, si es requerido.
- b) Extracción y purificación del ácido nucleico, si es requerido.
- c) Amplificación de la secuencia objetivo del ácido nucleico por PCR usando (cebadores o iniciadores) específicos.
- d) Detección de los productos específicos de PCR.
- e) Confirmación de la identidad del producto PCR; y/o
- f) Confirmación por un método de cultivo microbiológico estandarizado (EN/ISO).

Preparación de la muestra: El objetivo de los métodos de preparación de muestras es obtener muestras o ácidos nucleicos de calidad y en cantidad adecuada para PCR (la calidad de los ácidos nucleicos depende por ejemplo de la pureza química, la longitud promedio de las moléculas y la integridad estructural de las moléculas de ácido nucleico extraídas). El enriquecimiento y el tratamiento de la muestra deben permitir la detección de un bajo número de microorganismos objetivo y la reducción de sustancias inhibidoras de PCR. El empleo de procedimientos físicos, químicos o bioquímicos menos destructivos

de la integridad del ácido nucleico harán la muestra o la solución del ácido nucleico compatible a la amplificación mediante PCR.

El tratamiento de la muestra puede iniciar directamente desde la muestra o después del enriquecimiento; los principios básicos de la extracción del ácido nucleico consisten en la liberación del ADN presente en la bacteria y además, al mismo tiempo o posteriormente, remover los inhibidores de PCR. (ISO 20837:2006)

Material de Prueba.

Cualquier alimento para consumo humano o animal es apropiado como material de prueba siempre que haya sido establecido que la solución del ácido nucleico preparada de la muestra no inhibe la PCR.

Requisitos generales de laboratorio.

La contaminación accidental del ADN puede originarse con polvo y aerosoles. Debido a esto, la organización del área de trabajo en el laboratorio y las buenas prácticas deberán estar basadas en:

- a) La contención sistemática de los pasos metodológicos involucrados en la producción de resultados y
- b) El principio "Sin retorno" para el manejo de la muestra.

Estas medidas aseguran que el ADN en el material de prueba y el ADN amplificado por PCR permanecen físicamente separados. (ISO/FDIS 22174:2005)

II.1.2. Personal (5.2)

Todo el personal que realice actividades del método de ensayo deberá estar calificado y tener experiencia para trabajar con la técnica de PCR; además tener conocimientos básicos sobre microbiología general, validación de métodos de ensayo, matemáticas, inglés y buenas prácticas de laboratorio.

Debe realizarse cambio de bata de laboratorio en las etapas pre y post- PCR. Durante la preparación de la muestra deben utilizarse guantes desechables. (ISO/FDIS 22174:2005)

II.1.3. Instalaciones y condiciones ambientales (5.3)

Configuración del laboratorio.

Para prevenir la contaminación de la mezcla de reacción por las secuencias objetivo previamente amplificadas deberá asegurarse que están disponibles áreas de trabajo separadas con sus propios equipos. (ISO/FDIS 22174:2005)

Áreas de trabajo.

Se requiere un mínimo de cuatro áreas separadas dedicadas al trabajo:

- a) Para la preparación de la solución del ácido nucleico desde el material de prueba.
- b) Para la preparación de la mezcla de reacción (mastermix).
- c) Para la adición de la solución del ácido nucleico preparada desde el material de prueba.
- d) Para la detección y confirmación de los productos de PCR.

La amplificación puede ser realizada en el área de trabajo c) o en el área de trabajo d).

Si el termociclador es colocado en el área de trabajo c), los tubos que contienen los productos de la reacción de amplificación no deberán abrirse en esta área.

Un conjunto diferente de pipetas deberán utilizarse para la preparación de la muestra y la preparación de la mezcla de reacción de la PCR.

La separación física a través del uso de diferentes cuartos es la manera más efectiva y preferible de asegurar áreas e instalaciones de trabajo. (ISO/FDIS 22174:2005)

Manejo de desechos.

Los productos de PCR deben ser destruidos usando una solución de hipoclorito al 3% (fracción masa).

Deben utilizarse procedimientos adecuados para el manejo de desechos y descontaminación. (ISO/FDIS 22174:2005)

II.1.4. Método de ensayo y validación del método (5.4)

Método de ensayo

Enriquecimiento y tratamiento de la muestra para las bacterias.

Las muestras de alimentos deben ser enriquecidas de acuerdo a los correspondientes estándares ISO listados en el Anexo A o en otro estándar apropiado. Puede utilizarse otro medio de enriquecimiento que sea más compatible con PCR, siempre y cuando se haya demostrado a través de validación que su funcionamiento es al menos comparable con el de los estándares ISO.

Algunos medios de enriquecimiento recomendados en los estándares ISO contienen menos sustancias inhibitoras de PCR que otros; esto debe ser considerado cuidadosamente cuando se decida cambiar el método de preparación de la muestra.

Para algunos productos debe tomarse especial cuidado para suprimir el crecimiento de microorganismos de segundo plano que compiten; por ejemplo mediante la adición de químicos o antibióticos selectivos. (ISO 20837:2006)

Pueden utilizarse métodos menos destructivos tales como una simple dilución, centrifugación, digestión de la proteína, filtración, separación inmunomagnética. En caso de que exista falta de respuesta de PCR pueden probarse métodos más rigurosos tales como ebullición, el uso de agentes quelantes o químicos duros como el cloroformo y etanol o kits con acción similar. Pueden utilizarse métodos físicos simples para reducir el contenido de grasa en las muestras con alto contenido de ella. Pueden utilizarse agentes quelantes para reducir el alto contenido de calcio en los productos lácteos lo cual puede ser un agente inhibidor. (ISO 20837:2006)

Extracción y purificación del ADN.

Pueden combinarse varios principios para la extracción del ADN, por ejemplo:

- a) Degradar las proteínas en el extracto celular con proteasas (por ejemplo, Proteinasa K) y el ARN con ribonucleasas.
- b) Precipitar los péptidos resultantes con solventes orgánicos (por ejemplo, una mezcla de fenol y cloroformo) para dejar el ADN en la fase acuosa.
- c) Purificar la solución de ADN y posteriormente concentrarla mediante precipitación con etanol en presencia de cationes monovalentes.
- d) Recoger el precipitado de ADN por centrifugación.
- e) Lavar el ADN con etanol y re suspender en buffer, por ejemplo: tris (hidroximetil) aminometano- buffer EDTA (buffer Tris- EDTA) o buffer Tris.

Pueden utilizarse co-precipitantes de ADN tales como el glucógeno, polietilenglicol de elevado peso molecular (PEG 8000, 5000, 6000, etc) o ARN de transferencia (ARNt) para mejorar la recuperación de ADN durante los pasos de precipitación. Solo pueden utilizarse co-precipitantes sin alguna actividad de nucleasa y sin inhibidores/competidores de PCR y sin alguna secuencia homóloga a la objetivo (blanco) de la PCR bajo estudio.

Utilizar secadores de vacío para secar el ADN precipitado puede causar contaminación cruzada.

El ADN puede ser liberado por ruptura celular térmica, por ejemplo por ebullición durante 10 minutos; después de la ebullición la muestra enfriada es centrifugada y el sobrenadante es utilizado para la reacción de PCR. Para facilitar la ruptura celular puede aplicarse antes de la ebullición un tratamiento enzimático. Pueden requerirse otros métodos tales como agitación vigorosa con perlas de ebullición cuando el microorganismo tiene una pared celular particularmente resistente. (ISO 20837:2006)

Calidad y cantidad del ADN.

La calidad y el rendimiento del ADN extraído usando un método dado sobre una matriz dada deberán ser repetible y reproducible en términos de amplificación mediante PCR, siempre que una cantidad suficiente de ADN esté presente en la matriz. En particular el método usado debe permitir la recuperación de fragmentos de ADN con un tamaño promedio igual o más largo que los productos de PCR bajo estudio.

La concentración y pureza del ADN aislado puede ser estimada por métodos fluorométricos o por electroforesis en gel. El ADN purificado también puede cuantificarse por métodos espectrofotométricos.

Una rápida manera para estimar la calidad y cantidad de ADN es en electroforesis en gel de agarosa, seguida por una tinción con bromuro de etidio y fluorescencia bajo luz ultravioleta. Para algunos métodos de preparación de la muestra (por ejemplo la ebullición) es necesario usar la solución del ácido nucleico directamente después de la preparación, porque los ácidos nucleicos liberados no son estables.

En general deben evitarse el congelamiento y descongelamiento de las soluciones del ácido nucleico; además deben utilizarse artículos de plástico apropiados para almacenar pocas copias de ácidos nucleicos.

Amplificación por PCR.

La amplificación de secuencias específicas de ácido nucleico puede ocurrir in vitro a través de una reacción catalizada por una ADN polimerasa en presencia de cebadores (iniciadores) oligonucleótidos y desoxinucleótidos trifosfatos en un buffer de reacción definido. Un requisito importante para la amplificación de la secuencia objetivo es que no haya inhibición de la ADN polimerasa en la reacción. La amplificación del ADN es un proceso cíclico que consta de:

- Desnaturalización del ADN de doble banda en un ácido nucleico de una banda por medio de calentamiento.
- Alineación de los cebadores (iniciadores) oligonucleótidos a la secuencia objetivo complementaria en ambas bandas (separadas) de ADN a una temperatura adecuada.
- Extensión de los cebadores (iniciadores) con desoxirribonucleótidos trifosfatados por una ADN polimerasa a una temperatura adecuada. (ISO 20838:2006)

Detección y/o confirmación de productos de PCR.

Los productos de PCR pueden ser detectados por electroforesis en gel o una alternativa apropiada. El tamaño de los productos de PCR puede ser estimado en comparación con estándares adecuados de ADN de longitud conocida cuando corren en paralelo con los productos de PCR bajo prueba.

La confirmación de la identidad del producto de PCR debe ser desarrollada por otro método apropiado que el de la determinación del tamaño, por ejemplo:

- Por hibridación del producto de PCR con sondas específicas de ADN
- Llevando a cabo análisis de restricción del producto de PCR. La longitud de los fragmentos después de la restricción deben corresponder a la longitud esperada de la secuencia objetivo del ADN después de la restricción.
- Empleando cebadores (iniciadores) para una secuencia alternativa dentro del producto de PCR (tomando particular cuidado para evitar contaminación cruzada)
- Por secuenciación del ADN del producto de PCR.
- Un resultado positivo puede confirmarse también y alternativamente utilizando un cultivo microbiológico estandarizado y un método de confirmación como los descritos en los estándares EN/ISO adecuados.

Consideraciones generales para la reacción de amplificación: Las condiciones de reacción y las condiciones de termociclado deben ser optimizadas para cada par de cebadores y/o sistema. Cuando cualquier PCR es utilizado por primera vez o se trata de un extracto o suspensión derivado de una matriz particular se hace necesario demostrar que las condiciones de reacción son adecuadas para alcanzar el límite de detección deseado.

El límite de detección del método de PCR debe ser determinado como el número de microorganismos objetivo requerido para producir la unidad de suspensión adicionada a PCR. En una reacción óptima se requieren menos de 40 ciclos para amplificar moléculas

objetivo para obtener un producto que sea fácilmente detectable por los métodos estandarizados; cuando el número de ciclos se incrementa pueden acumularse productos inespecíficos. Una reacción de PCR optimizada debe ser capaz de amplificar en 40 ciclos o menos suficientes copias del producto de PCR para ser detectable. Si es posible esto podría ser de aproximadamente 100 copias del templado puro de ADN.

Las condiciones prescritas en un método de PCR deben seguirse estrictamente y además debe demostrarse la ausencia de inhibición de PCR a través de los controles apropiados.

Aspectos del diseño del primer: Las secuencias de los cebadores deben tener preferentemente las siguientes características de diseño:

- Longitud entre 18 y 30 nucleótidos,
- Radio GC:AT de 50:50 si es posible, o tan cercano a este radio como sea posible
- No debe haber concentración de Gs y Cs en segmentos cortos de cebadores (alta sensibilidad interna),
- La banda complementaria no debe terminar en 3' para evitar la formación de dímeros.
- No debe existir una estructura secundaria interna
- Evitar la posible formación de dímeros con cebadores o pruebas usadas en PCR.

Existen paquetes de software disponibles comercialmente para ayudar en el diseño de cebadores.

Verificación de la especificidad del cebador: Debe demostrarse la habilidad de los cebadores para detectar la secuencia objetivo, esto puede realizarse idealmente en dos pasos: una primera evaluación teórica y una segunda evaluación empírica.

La evaluación teórica debe hacerse con una secuencia similar a la investigada contra una secuencia del ácido nucleico principal de la base de datos.

Para la evaluación empírica independientemente del criterio del diseño utilizado, la especificidad de los cebadores debe ser evaluada empíricamente para confirmar su habilidad para discriminar entre la secuencia objetivo y las secuencias y controles negativos de microorganismos (especies/cepas) relacionadas cercanamente. (ISO 20838:2006)

Validación del método

Debido a la amplitud de este punto, la validación fue desarrollada en un capítulo por separado dentro de esta tesis.

Incertidumbre de medida

Debido a la amplitud de este punto, la incertidumbre fue determinada en un capítulo por separado dentro de esta tesis.

II.1.5. Equipo y Reactivos (5.5)

Equipo

Se deben utilizar instrumentos y equipos de medición con mantenimiento apropiado de acuerdo a las instrucciones del fabricante y los requisitos dados en ISO/IEC 17025.

Cuando sea apropiado debe realizarse la calibración rutinaria del equipo cuyo funcionamiento puede impactar en el resultado producido.

Materiales, instrumentos y equipo de medición especiales: Además de equipo o material estándar de laboratorio, deben utilizarse:

- a) Termociclador; aparato capaz de realizar reproduciblemente y exactamente los ciclos de temperatura y tiempo descritos en un método de PCR. Con rango de temperatura de 0-100°C, precisión de la temperatura $\pm 0.2^\circ\text{C}$, uniformidad $\pm 0.4^\circ\text{C}$.
- b) Pipetas de pistón; ya sea con filtros o sin filtros son necesarias para los pasos en un método de PCR incluyendo la amplificación. Con alcance a 5, 50 y 100 μl y con incertidumbre expandida ($k=2$) de $\pm 0,8\%$, $\pm 0,3\%$ y $\pm 0,3\%$ del volumen respectivamente.
- c) Espectrofotómetro UV-Vis; con exactitud de longitud de onda aceptable (UV ± 1 nm, Vis ± 3 nm), exactitud fotométrica (error entre $\pm 2\%$ óptima, entre $\pm 3\%$ aceptable), precisión fotométrica (coeficiente de variación $< 0,5\%$ óptima, $< 1\%$ aceptable), linealidad fotométrica (coeficiente de regresión $\geq 0,999$ aceptable).
- d) Tubos (contenedores) de reacción los cuales deben ser repetidamente calentados a 100°C y enfriados a 4°C sin daño.
- e) Sistema para la detección de productos de PCR como son:
 - Aparatos para electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida y si es necesario una fuente de radiación UV para registrar la visualización del ADN amplificado; o
 - Aparatos para cromatografía en columna de ácidos nucleicos y el sistema de detección apropiado; o
 - Fases sólidas cargadas con una prueba específica y aparatos para detectar productos de PCR; u
 - Otro sistema igualmente adecuado.

Siendo el Termociclador el equipo cuyo funcionamiento impacta en mayor medida en el resultado de PCR producido, se presenta a continuación el procedimiento para su calificación; entendiendo como calificación a la *“evidencia documentada que proporciona un alto grado de certeza de que un equipo, área o sistema producirá consistentemente un resultado dentro de especificaciones previamente establecidas”*. (Guía de Buenas Prácticas de Validación, 2006, p.50) y que está conformada por las siguientes actividades:

- A. **Calificación del Diseño (CD)** que se define como: *“Una verificación documentada que demuestra que el diseño de instalaciones, sistemas y equipos es apropiado para el propósito establecido basado en el cumplimiento de las especificaciones de requerimientos del usuario”*. (Guía de Buenas Prácticas de Validación, 2006, p.53).

Está a cargo del fabricante del equipo.

- B. **Calificación de la Instalación (CI)** que se define como: *“Una verificación documentada de que las instalaciones, sistemas y equipos cumplen con las especificaciones de diseño y que están instaladas en forma adecuada para su uso”*. (Guía de Buenas Prácticas de Validación, 2006, p.55).

Instalación del termociclador

Deben seguirse las instrucciones del fabricante y además tomar en consideración lo siguiente:

- a) Deben ser instalados y utilizados a temperatura y humedad apropiadas.
- b) Deben estar ubicados de tal forma que puedan ser inspeccionados visualmente, permitir un intercambio constante de temperatura con el ambiente y libre circulación de aire.
- c) Deben permanecer en un ambiente constante. (ISO/TS 20836:2005)

- C. **Calificación de la Operación (CO)** que se define como: *“Una verificación documentada de que las instalaciones, sistemas y equipos funcionan en forma adecuada de acuerdo a los parámetros de operación con base en el diseño”*. (Guía de Buenas Prácticas de Validación, 2006, p.61)

Prueba Física de funcionamiento: (ISO/TS 20836:2005)

Alcance: Este es un método para verificar la exactitud de la temperatura del termociclador bajo condiciones de ciclado. La prueba registra la temperatura del líquido en un tubo de muestra.

Principio: La temperatura es medida por termopares u otros instrumentos los cuales sean capaces de registrar la temperatura en el interior de un vial que contenga agua ultrapura.

El procedimiento de la prueba física debe realizarse bajo condiciones de ciclado PCR. Esto visualmente comprende una secuencia de tres niveles de temperatura consecutivas usadas para desnaturalización, alineación de iniciadores y extensión de iniciadores. Si el termociclador tiene una tapa térmica, entonces la medición deberá hacerse con la tapa en operación.

Para consultar información detallada del procedimiento de la prueba física de funcionamiento para termocicladores consultar el documento ISO/TS 20836:2005.

- D. **Calificación del Desempeño (CF)** que se define como: *“Una verificación documentada de que las instalaciones, sistemas y equipos, se desempeñan en forma adecuada de acuerdo a los parámetros específicos del proceso en el que serán utilizados”*. (Guía de Buenas Prácticas de Validación, 2006, p.62).

Prueba bioquímica de funcionamiento:

Un procedimiento bioquímico para la prueba de funcionamiento del termociclador puede ser a una temperatura sensible en un sistema de PCR no robusto.

Alcance: Este método verifica la exactitud en el control de la temperatura de alineación del termociclador. La prueba es sensible a un incremento en la

temperatura real de alineación relativo a la temperatura desplegada durante un ciclo programado con temperatura definida.

Principio: La exactitud de la temperatura programada/desplegada es confirmada llevando a cabo una reacción de PCR diseñada específicamente. Las muestras utilizadas son altamente sensibles a un incremento en la temperatura de alineación durante el ciclo de temperatura. Las muestras deben ser colocadas en posiciones que sean representativas del área controlada térmicamente incluyendo posiciones críticas.

Para consultar información detallada del procedimiento de la prueba bioquímica de funcionamiento para termocicladores consultar el documento ISO/TS 20836:2005.

La frecuencia de las pruebas de funcionamiento debe estar basada sobre las horas documentadas de uso o el número de corridas de cada termociclador.

Mantenimiento de Termocicladores

Se debe establecer y emplear un programa de mantenimiento definido para cada termociclador basado en las horas de uso documentadas o número de corridas.

Reporte de prueba y documentación de irregularidades

Se debe generar un reporte de prueba del termociclador y documentación de irregularidades. El reporte de la prueba debe ser conforme a la norma ISO/IEC 17025 y contener al menos lo siguiente:

- Número de identificación del termociclador
- Una referencia para esta especificación técnica y anexo utilizado para la prueba
- Fecha de la prueba
- Persona responsable de realizar la prueba
- Resultados de la prueba
- Cualquier punto particular observado durante la prueba
- Cualquier desviación, adición o exclusión de la especificación de la prueba
- Cualquier otra información relevante a la prueba específica.

Se deben tener procedimientos documentados para identificar y tratar cualquier irregularidad concerniente al funcionamiento de los termocicladores. (ISO/TS 20836:2005)

Reactivos

En todos los casos deben utilizarse reactivos analíticamente puros, adecuados para métodos de detección de microorganismos y virus en biología molecular. Generalmente es recomendable tomar alícuotas de las soluciones de reacción requeridas para un método de PCR y almacenarlas bajo condiciones apropiadas por ejemplo a -20°C.

A los reactivos especificados a continuación aplican requisitos especiales. (ISO 20838:2006)

ADN Polimerasa

Se requiere una polimerasa termoestable (posiblemente incluyendo la actividad de transcriptasa reversa). Ésta puede ser una forma purificada de la enzima natural o una forma recombinante construida genéticamente.

Debe ser utilizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Nota: Cada ADN polimerasa puede necesitar diferentes condiciones experimentales.

Transcriptasa reversa

Enzima utilizada para transcribir ARN en ADN de una banda capaz de ser amplificado por un subsecuente método de PCR.

Debe ser utilizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Nota: Solamente se requiere cuando el ARN viral está siendo determinado.

Buffer de reacción

Debe utilizarse el buffer apropiado de acuerdo a las instrucciones del fabricante de la enzima.

Se encuentran comercialmente disponibles reactivos listos para usarse. Los materiales utilizados para la preparación de un buffer de reacción de PCR deben ser estables con respecto a las condiciones de almacenamiento y ciclado.

Deben utilizarse de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Desoxirribonucleotidos trifosfatados (dNTPs) para PCR

Las soluciones que contienen dATP, dCTP, dGTP, dTTP y/o dUTP grado biología molecular deben ser almacenados y utilizados como sea apropiado. Deben permanecer estables durante el almacenamiento y bajo condiciones de PCR. Se encuentran comercialmente disponibles.

Cebadores (iniciadores)

La secuencia del cebador (iniciador) debe ser altamente complementaria a la secuencia objetivo de ADN y el diseño de los cebadores debe evitar la alineación misma.

Agua

Para la reacción de amplificación el agua debe ser libre de DNasas y RNasas. Se encuentra disponible comercialmente agua grado biología molecular.

Cloruro de magnesio y químicos para la detección de productos de PCR

Los químicos usados para el sistema de detección en un método de PCR deben ser de calidad apropiada.

Reactivos opcionales adicionales

- Facilitadores: Son sustancias tales como el polietilenglicol o suero de albúmina bovina las cuales pueden ser adicionadas a la reacción de PCR para reducir la inhibición por las sustancias derivadas de la matriz.
- Inhibidores de RNasas: Son adicionados a un RT-PCR para prevenir degradación del RNA objetivo por enzimas RNasas las cuales podrían haber contaminado reactivos o contenedores de plástico usados en el procedimiento de extracción. Se encuentran inhibidores de RNasas disponibles comercialmente.

Reactivos para prevenir contaminación cruzada de los productos de PCR: Como una protección posterior contra la contaminación particularmente si la separación física de las áreas de trabajo no es posible, un sistema de desinfección (basado en psoraleno, dUTP y UNG por ejemplo) puede ser incluido en el sistema de PCR para minimizar el riesgo de contaminación cruzada de los productos de PCR durante las reacciones previas. (ISO 20838:2006)

II.1.6. Trazabilidad de la medición (5.6)

Debido a la amplitud de este punto, la trazabilidad será tratada en un capítulo por separado en esta tesis.

II.1.7. Muestreo (5.7)

El muestreo es un procedimiento definido por medio del cual se toma una parte de una sustancia, material o producto para proporcionar al ensayo una muestra representativa del total.

En muchos casos, los laboratorios de ensayo no son responsables del muestreo inicial para obtener los especímenes del ensayo.

Para la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de patógenos en alimentos es difícil hacer un muestreo representativo de un alimento, dado que la población microbiológica se distribuye en forma no homogénea, de modo que puede tomarse una porción del alimento en la que no se encuentran los microorganismos.

Además, es necesario seleccionar el alimento en base a la frecuencia de la presencia del microorganismo objetivo en el alimento eligiendo la categoría más conveniente.

El documento ISO 16140:2003 recomienda las siguientes categorías de alimentos y tipos de productos para obtener las muestras relevantes a los principales patógenos.

- Productos de carne: crudos, procesados mediante calor, congelados, fermentados, curados, otros.
- Aves de corral: crudas, procesadas mediante calor, congeladas, otros.
- Pescado y productos del mar: crudos, procesados mediante calor, congelados, ahumados, otros.
- Productos basados en frutas y verduras: crudos, procesados mediante calor, congelados, secos, fermentados, curados/salteados, jugos/concentrados, baja humedad, otros.
- Productos lácteos: crudos, procesados mediante calor, congelados, fermentados, secos, otros.
- Productos de chocolate y panadería: baja humedad, secos, otros.
- Alimentos para animales: misceláneos

Un aspecto importante de la adecuada realización del muestreo es determinar cómo afecta éste a la incertidumbre de medida.

Existen documentos ISO que sirven de guía para realizar el muestreo dependiendo de la naturaleza del alimento como ejemplo se pueden citar: ISO 6887 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal, Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico e ISO/FDIS 17604 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Muestreo de cadáveres para análisis microbiológico.

II.1.8. Manejo de los ítems (elementos) de ensayo (5.8)

Iniciar el tratamiento de la muestra directamente de la muestra o después del enriquecimiento. Las muestras de prueba pre-enriquecidas deben repartirse en alícuotas de 1 ml y almacenarse a -30°C hasta su uso por cada laboratorio (en el caso de la validación). Cada laboratorio debe tener el procedimiento de operación estándar para realizar la detección del patógeno por el método de PCR. Si las muestras son de diferentes alimentos deben analizarse separadamente en cada laboratorio con el fin de evitar contaminación cruzada.

Las muestras pre-enriquecidas congeladas deben descongelarse y realizar la extracción (por lisis celular), la preparación del ácido nucleico y/o purificación de la muestra de prueba, si es requerido deberán realizarse de acuerdo al método que se describió previamente en el apartado 5.4 Método de ensayo y validación.

II.1.9. Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo (5.9)

Control de Calidad Interno

La calidad, integridad y cantidad del templado de ADN influye en los resultados de PCR para la detección de patógenos en alimentos.

Debido al riesgo de obtener resultados falsos positivos y/o negativos, en cada ensayo de PCR deben incluirse controles positivos (secuencia objetivo presente) y controles negativos (secuencia objetivo ausente) apropiados. Si están disponibles y son apropiados, deben usarse materiales de referencia certificados y cultivos de referencia como controles positivos y negativos.

La frecuencia de uso debe ser determinada como parte del programa de aseguramiento de calidad.

Deben incluirse controles adicionales a intervalos de tiempo regulares y siempre que uno de los controles no produzca los resultados esperados. (ISO 20838:2006)

A continuación se presentan los controles requeridos para el análisis de las muestras basados en PCR.

	Control de proceso negativo a	Control de proceso positivo a	Control de extracción negativo b	Control de amplificación interno/externo c	Control positivo PCR d	Control negativo PCR d
Tratamiento de la muestra	↓	↓				
Extracción del ácido nucleico	↓	↓	↓			
Amplificación	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Detección	↓	↓	↓	↓	↓	↓
a La frecuencia de uso debe ser determinada como parte del programa de aseguramiento de calidad del laboratorio. b Este control no es necesario cuando el control de proceso negativo es realizado. c El control de amplificación interno o externo debe ser realizado en cada reacción PCR. d Este control es necesario para cada lote de muestras en un ciclo corrido. ↓ Procedimiento cubierto por este control.						

Cuadro 1. Controles requeridos para el análisis de muestras basado en PCR (ISO/FDIS 22174:2005)

Confirmación de resultados de PCR

La presencia del producto de PCR y su especificidad deben ser demostradas por una adecuada reacción de confirmación (un resultado positivo de PCR puede ser confirmado también por un método de cultivo tradicional).

Los resultados obtenidos incluyendo los controles especificados anteriormente no deben ser ambiguos y deben producir los resultados esperados, además de que el procedimiento debe ser repetido. (ISO/FDIS 22174:2005)

Los resultados de PCR serán:

- a) Positivo si un producto específico de PCR ha sido detectado y todos los controles dan los resultados esperados; o
- b) Negativo dentro de los límites de detección si un producto específico de PCR no ha sido detectado y todos los controles dan los resultados esperados.

En la siguiente tabla se presentan los posibles resultados de PCR y su interpretación.

Muestra de Prueba	Control de proceso positivo	Control positivo PCR	Control de proceso negativo. Control de extracción negativo Control negativo PCR	Control interno de Amplificación	Control externo de Amplificación	Interpretación de resultados
+	+	+	-	+/-	+	Positivo
-	+	+	-	+	+	Negativo
+	+	+	+	+/-	+/-	Poco concluyente a
-	-	+	-	-	-	Poco concluyente b
+ Producto PCR detectable. - Ningún producto de PCR detectable a Posible contaminación b Posible inhibición						

Cuadro 2.Resultados de PCR (ISO/FDIS 22174:2005)

Control de Calidad Externo (Ensayos de aptitud)

El método de PCR debe estar sujeto a una prueba interlaboratorio o intralaboratorio para determinar las características de funcionamiento. Los valores derivados de cualquiera de estas pruebas pueden no ser aplicables para analizar otros valores de concentración y matrices que los usados en la prueba.

El aseguramiento de la calidad debe incluir la validación del método, calibrar y confirmar los instrumentos de medición, calificar y confirmar el equipo de medición y entregar el resultado con la incertidumbre estimada.

II.1.10. Informe de resultados (5.10)

El informe de la prueba debe realizarse conforme a los requisitos de ISO/IEC 17025 y debe contener al menos la siguiente información:

- Toda la información necesaria para identificar la muestra de laboratorio.
- Cualquier punto particular relacionado a la muestra de laboratorio (ej. Tamaño insuficiente, estado degradado).
- Una referencia para el estándar utilizado para la prueba y los métodos seguidos.
- Fecha de recepción.
- Condiciones de almacenamiento.
- Fecha de inicio / término del análisis.
- Persona responsable del análisis.

- h) Tamaño de la porción de prueba.
- i) Resultados de la prueba.
- j) Cualquier punto en particular observado durante la prueba.
- k) Cualquier desviación, adición o exclusión de la especificación de la prueba y cualquier otra información relevante a la prueba en específico. (ISO/FDIS 22174:2005)

CAPITULO III

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS

En este capítulo se presenta la metodología propuesta para validar este tipo de ensayos considerando que la norma ISO 17025 nos dice al respecto:

5.4.5.1 La Validación es la confirmación por examen y la provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico propuesto.

5.4.5.2 La validación debe ser tan extensiva como sea necesario para satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de aplicación dado.

NOTA2. Las técnicas usadas para la determinación del desempeño de un método puede ser una o la combinación de las siguientes:

- Calibración usando patrones de referencia o materiales de referencia;
- Comparación de resultados alcanzados con otros métodos;
- Comparaciones entre laboratorios;
- Evaluación sistemática de los factores que tienen influencia en los resultados;
- Evaluación de la incertidumbre de los resultados con base en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y de la experiencia práctica.

Y el documento de aplicación **EA-4/10** establece:

4.2 Los métodos de ensayo microbiológico cualitativos cuyo resultado se expresa en términos de detectado/no detectado y los procedimientos de confirmación e identificación, deben ser validados estimando, cuando sea apropiado, su especificidad, exactitud relativa, desviación positiva, desviación negativa, límite de detección, efecto matricial, repetibilidad y reproducibilidad.

III.1. MÉTODO DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS: VALIDACIÓN (DEMOSTRACIÓN DE BUEN FUNCIONAMIENTO O DESEMPEÑO)

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se demuestra, mediante estudios de laboratorio, que la capacidad de desempeño del método satisface los requisitos para las aplicaciones específicas, nos da una idea de las limitaciones que pueden ser experimentadas durante el uso rutinario, mientras el método esté bajo control; además pretende la confirmación de la especificidad y reproducibilidad del método cuando sea usado por diferentes laboratorios. Un procedimiento común para obtener datos de validación es un estudio interlaboratorios en el cual el funcionamiento del método es probado usando material idéntico en varios laboratorios bajo el control de un

laboratorio supervisor. En este proceso es importante simular las condiciones de la vida real, por ejemplo, debe considerarse el uso de muestras naturalmente contaminadas. (Malorny, et. al. 2003 a)

La validación de un método consiste de dos etapas:

- a) Un estudio en donde el método de diagnóstico basado en PCR sea comparado con el método de referencia actual (en este caso la detección de patógenos en alimentos por el método tradicional), utilizando muestras inoculadas con un nivel conocido de microorganismos y muestras contaminadas naturalmente.
- b) Un estudio interlaboratorios.

Los siguientes términos importantes y fórmulas que se utilizan, así como el diseño del estudio colaborativo (interlaboratorios) están basados en las Guías Básicas ISO-5725-1 1994 Accuracy (trueness and precisión) of measurement methods and results Part. 1:General principles and definitions e ISO-5725-2 1994 Accuracy (trueness and precisión) of measurement methods and results Part. 2:Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method y en el Protocolo MICROVAL ISO 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs- Protocol for the validation of alternative methods.

Exactitud analítica y diagnóstica

El método basado en PCR debe tener un alto grado de exactitud analítica y diagnóstica. La exactitud analítica incluye la **selectividad**, definida como una medida del grado de respuesta de los microorganismos objetivo y no objetivo utilizando cepas puras y el **límite de detección**.

Consecuentemente un método selectivo basado en PCR comprende **inclusividad** (detección del patógeno objetivo de un amplio rango de cepas) y **exclusividad** (falta de respuesta desde un rango relevante de cepas relacionadas pero no objetivo).

La exactitud diagnóstica toma en cuenta a los microorganismos objetivo y no objetivo en presencia de una matriz biológica y comprende los términos **especificidad y sensibilidad**.

La especificidad diagnóstica se define como una medida del grado al cuál el método es afectado por componentes no objetivo presentes en una matriz biológica, lo cual podría generar resultados falsos- positivos. La sensibilidad diagnóstica se define como una medida del grado para detectar el patógeno objetivo en la matriz biológica, lo cual podría generar resultados falsos- negativos. Un alto grado de exactitud diagnóstica significa por lo tanto, detectar verdadera y precisamente al microorganismo objetivo en presencia de una matriz biológica sin interferencia de componentes no objetivo. Por lo tanto la exactitud diagnóstica es utilizada para evaluar la concordancia entre los resultados de un método basado en PCR y el método de referencia tradicional aceptado.

Límite de Detección: El método basado en PCR debe tener un aceptable límite de detección. Los estándares internacionales derivados de los métodos de detección tradicionales requieren una detección mínima de una célula por 25 g de muestra. El límite

de detección teórico de una célula microbiana por la reacción de PCR puede usualmente ser trasladado en la práctica a $10^3 - 10^4$ células por ml de muestra pre-enriquecida, de tal forma que un volumen pequeño de la matriz inicial es usada en la reacción de PCR. Por lo tanto, un ensayo de PCR usualmente precedido por un paso de enriquecimiento para una multiplicación primaria de células bacterianas debe detectar al menos 10-100 copias del ADN bacteriano objetivo en la reacción. El límite de detección puede ser determinado en relación al cálculo de la probabilidad de detección; de esta manera, la frecuencia relativa esperada de una respuesta positiva de PCR a varias concentraciones de ácidos nucleicos objetivo o células puede establecerse.

Robustez

El método basado en PCR debe ser tolerante hacia un rango de parámetros físicos y químicos. Los parámetros más críticos usualmente son: la calidad del templado de ADN (integridad física del ADN cromosómico genómico, ausencia o presencia de inhibidores de PCR), diferencias por lote en la pureza de los reactivos, errores de pipeteado, exactitud de las temperaturas alcanzadas, tiempos de duración en cada paso de PCR y el diseño de los cebadores.

La robustez del método es un indicador de la reproducibilidad interlaboratorios. Sin embargo, los instrumentos y equipos de medición usados (termociclador, pipetas, etc.), deben ser verificados rutinariamente para un buen funcionamiento.

La exactitud analítica incluye validación primaria sobre cultivos celulares purificados para el establecimiento de la probabilidad de detección y selectividad.

III.1.1. Cepas bacterianas de referencia (microorganismos objetivo)

Para los microorganismos debe elegirse un rango de cepas para evitar desviaciones locales, cada cepa debe ser caracterizada bioquímicamente, serológicamente y si es relevante genéticamente, con suficiente detalle. Deben ser aisladas preferentemente de alimentos, también se deben conocer y documentar los alimentos o materiales de los cuales fueron aisladas. (ISO 16140:2003)

Para pruebas de inclusividad, en general es conveniente seleccionar un número de cepas (objetivo) que represente todas las subespecies conocidas con énfasis en los serotipos aislados con más frecuencia en los humanos y otros serotipos epidemiológicamente importantes.

Del total de cepas seleccionadas se debe elegir un número de ellas para la selección del par de cebadores y además seleccionar una cepa como la cepa de referencia que pertenezca a una colección reconocida.

Para las pruebas de exclusividad se debe elegir un conjunto de cepas no objetivo, elegidas básicamente porque están relacionadas cercanamente a la cepa objetivo o porque se encuentran en el mismo ambiente y crecen bajo las mismas condiciones, una parte del conjunto de cepas no objetivo seleccionadas se utiliza para la selección preliminar del par de cebadores y las restantes para pruebas de exclusividad extensas. (Malorny, et.al. 2003 b)

III.1.2. Preparación de las muestras de ADN

Para las pruebas de selectividad las cepas objetivo y no objetivo se cultivan a través del método tradicional y de acuerdo al estándar ISO apropiado. Se realiza conteo viable en placa por duplicado. Se estima la concentración calculando el número promedio de UFC (unidades formadoras de colonias).

Considerado como un procedimiento general, una alícuota de 1 ml del cultivo enriquecido se centrifuga a 10 000 g en un tubo para micro centrífuga durante 5 min. a 4°C, el sobrenadante se elimina cuidadosamente y el paquete celular se resuspende en aproximadamente en 300 µl de buffer TE. (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, [pH 8.0]). El tubo para micro centrífuga se incuba durante 10 min. a 100°C en un baño de agua e inmediatamente se enfría en hielo. Posteriormente se centrifuga a 14 000 g a 4°C durante 5 min. El sobrenadante que contiene el ADN se transfiere cuidadosamente a un nuevo tubo de micro centrífuga y una alícuota de 5µl es utilizada como el templado de ADN para la PCR. (Malorny, et.al. 2003 b)

III.1.3. Par de Cebadores y PCR

Actualmente es posible encontrar publicaciones sobre los pares de cebadores utilizados en muchos estudios para la detección de los principales patógenos transmitidos por alimentos así como las temperaturas de alineación y el tamaño de los productos de PCR (pb) para cada par de cebadores. Se deben elegir los más utilizados si están disponibles para la comparación y las reacciones de PCR se deben llevar a cabo en un termociclador.

Una mezcla típica para PCR de 25µl contiene una concentración de 0.4 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, buffer 1xPCR (Tris-HCl 20 mM[pH8.4], KCl 50 mM), MgCl₂ 1.5 mM, 0.75 U de polimerasa TaqPlatinum y 5 µl de la muestra de ADN (aproximadamente 10⁶ UFC por tubo de reacción).

Las condiciones para las PCRs pueden variar dependiendo del par de cebadores y del microorganismo en cuestión de manera general se maneja una temperatura de incubación de 95°C durante 1 minuto, seguido por 35 o 38 ciclos de 95°C durante 30 s, la temperatura de alineación para cada par de cebadores seleccionado durante 30s y 72°C durante 30 s. y una extensión final de 72°C durante 4 minutos. Para las pruebas de selectividad el ADN objetivo puede ser ciclado 35 veces y el ADN no objetivo puede ser ciclado 38 veces con el fin de detectar posibles fragmentos no objetivo en el producto de PCR.

Para la detección de los productos de PCR puede utilizarse la electroforesis con gel de agarosa con el fin de utilizar un método de detección simple y económico que puede estar disponible en muchos laboratorios. De manera general puede utilizarse una alícuota de 10 µl de un producto de PCR y cargarse sobre gel de agarosa al 1.8% conteniendo 0.5 µg de bromuro de etidio /ml y corrido a 6 V/cm durante 90 min. Debe utilizarse un marcador como el peso molecular estándar. El gel puede ser documentado con una video cámara. Una respuesta positiva se define como la presencia de una banda visible en el tamaño esperado, mientras que una respuesta negativa se define como la falta de alguna banda en el tamaño esperado. (Malorny, et.al. 2003 b)

III.1.4. Control de Amplificación Interno (CAI)

Con el fin de identificar resultados falsos negativos en los productos de PCR, debe construirse un CAI para el par de cebadores que resulte tener mayor selectividad. El método utilizado debe permitir la construcción de fragmentos cortos artificiales de ADN.

El CAI debe ser coamplificado con el ADN objetivo, resultando un amplicón (conjunto de moléculas de ADN idénticas que resulta de una PCR) de tamaño adecuado. (Malorny, et.al. 2003 b). El producto de PCR debe ser purificado para determinar la concentración espectrofotométricamente a 260 nm de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$[\text{ADN}] \mu\text{g/ml} = A_{260} \times \text{dilución} \times 50.0$$

en donde: A_{260} = Absorbancia a 260 nm (en densidades ópticas)

dilución = Factor de dilución empleado

50.0 = Coeficiente de extinción del ADN

La secuencia del CAI compuesta de varias secuencias del par de cebadores debe ser confirmada.

La siguiente ecuación se utiliza para calcular el número de copias de un producto de PCR de concentración conocida:

$$\frac{\text{Peso del fragmento de PCR (en gr/}\mu\text{l)}}{(660 \text{ g por mol} \times \text{No. de pares de bases}) \text{ del fragmento de PCR}} \times (6.023 \times 10^{23}) = \text{Número de copias genómicas por microlitro}$$

III.1.5. Determinación de la probabilidad de detección

La probabilidad de detección del microorganismo objetivo en una suspensión de concentración conocida en presencia de un CAI con número de copias definido de ADN se puede determinar de manera general conforme al siguiente procedimiento, siempre considerando que puede haber variaciones dependiendo del microorganismo en cuestión. Debe inocularse agua peptonada con la cepa de referencia seleccionada y que pertenezca a una colección reconocida, se incuba a la temperatura y por el tiempo adecuado dependiendo del microorganismo hasta la fase exponencial (aproximadamente 10^8 UFC/ml). La suspensión celular es serialmente diluida 10 veces en una solución de NaCl 0.9% (peso/vol) dentro del rango de concentraciones de 10^6 a 10^0 UFC/ml. Las diluciones pueden ser almacenadas hasta su uso a -20°C . Se determina el número aproximado de UFC por mililitro de suspensión celular mediante siembra en placa de 100 μl de la dilución que contiene 10^4 UFC/ml en el agar adecuado dependiendo el microorganismo objetivo cinco veces. El número promedio de UFC de las 5 placas se utiliza para recalcular la concentración (UFC/ml) de las diluciones congeladas, de tal forma que al descongelarlas se ajuste la concentración a aproximadamente 10^1 a 10^6 UFC/ml. Se agregan 5 μl a 5 tubos para PCR separados y se corren en presencia de 30 000 a 30 copias del CAI. El experimento debe repetirse un número adecuado de veces

por ejemplo 5, resultando en 30 PCRs para cada concentración celular. Cada PCR dará un resultado positivo o negativo para la concentración probada. La probabilidad de detección del ensayo de PCR se obtiene graficando el número relativo de PCRs positivos observados contra la concentración de la suspensión celular.

La determinación de la probabilidad de detección debe repetirse utilizando ADN purificado de la cepa de referencia seleccionada (de una colección reconocida) en el rango de concentración de 10^5 a 10^0 copias de ADN genómico por PCR. La purificación del templado de ADN puede hacerse utilizando un kit y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para determinar la concentración del ADN purificado se mide la densidad óptica a 260 nm con un espectrofotómetro y se calcula el número de copias genómicas del microorganismo objetivo.

Los resultados de las pruebas de inclusividad de los pares de cebadores probados con un panel de x número de cepas del microorganismo objetivo pueden reportarse en una tabla como la siguiente:

Serotipo (Subespecies)	Serogrupo	No. total de cepas	No. de cepas seleccionadas para la preselección	Tamaño del producto de PCR	No. de cepas con prueba positiva para el par de cebadores			
					A	B	C	D
Total		X	x		Ax	Bx	Cx	Dx

Una tabla similar deberá construirse para el conjunto de cepas de microorganismos no objetivo para reportar los resultados de las pruebas de exclusividad. De tal manera que pueda identificarse si todos los pares de cebadores probados amplificaron un producto de PCR del tamaño esperado o no tanto de las cepas del microorganismo objetivo (inclusividad) como de las del no objetivo (exclusividad). Además, para poder seleccionar el par de cebadores que haya identificado todas o la mayoría de las cepas del microorganismo objetivo seleccionadas para la pre selección considerándolo el par de cebadores más selectivo.

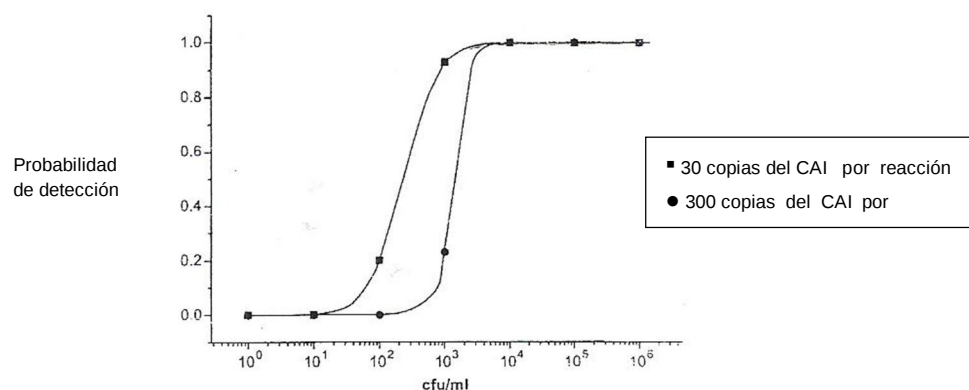
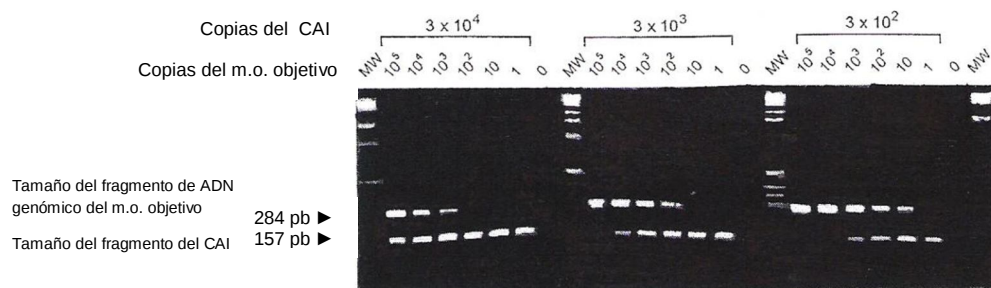
Como se mencionó anteriormente debe establecerse la probabilidad de detección del microorganismo objetivo a partir de la cepa de referencia que pertenezca a una colección reconocida a diferentes concentraciones celulares y de ADN usando el par de cebadores que haya resultado ser el más selectivo y en presencia de 30 a 30000 copias del CAI.

La siguiente figura nos muestra como a partir de los geles de agarosa obtenidos de las electroforesis se puede determinar el número apropiado de copias del CAI que deben ser usadas como templado al observar si la disminución del número inicial de copias del CAI incrementa o no la probabilidad de detección y en cuantas veces. Además se puede

observar cómo varía la probabilidad de detección de las suspensiones celulares que se encuentran a diferentes concentraciones con respecto al número de copias del CAI.

Cuando la intensidad de la señal del amplicón del CAI con 30 copias iniciales varía substancialmente entre PCRs idénticos nos indica pobre reproducibilidad.

Los resultados de las probabilidades de detección se pueden graficar para obtener una curva sigmoïdal. (Malorny, et.al. 2003 b).



III.1.6. Estudio Interlaboratorios usando el par de cebadores más selectivo

El objetivo de este estudio es validar la reproducibilidad de la exactitud analítica del ensayo de PCR para la detección de patógenos transmitidos por alimentos.

Las fórmulas utilizadas para el análisis se muestran a continuación y son características de una tabla de dos filas por dos columnas con respecto al método de cultivo de referencia y al método alternativo PCR. (Malorny, et.al. 2003 b).

		Método PCR		Σ
Método de cultivo		positivo	negativo	
	positivo	a Verdadero positivo	b Falso negativo	a + b
	negativo	c Falso positivo	d Verdadero negativo	c + d
Σ		a + c	b + d	

$$\text{Inclusividad (\%)} = \frac{a}{(a+b)} \cdot 100$$

$$\text{Exclusividad (\%)} = \frac{d}{(c+d)} \cdot 100$$

$$\text{Predictividad positiva (\%)} = \frac{a}{(a+c)} \cdot 100$$

$$\text{Predictividad negativa (\%)} = \frac{d}{(b+d)} \cdot 100$$

$$\text{Exactitud analítica (\%)} = \frac{a + d}{(a+b+c+d)} \cdot 100$$

$$\text{Índice Kappa (\%)} = \frac{2 (ad - bc)}{(a+c) \cdot (c+d) + (a+b) \cdot (b+d)} \cdot 100$$

El índice Kappa indica la intensidad de la relación entre las variables de las filas y columnas de una tabulación cruzada. Valores Kappa de < 0.01 indican que no hay concordancia, aquellos entre 0.1 y 0.4 indican débil concordancia, aquellos entre 0.41 y 0.60 indican clara concordancia, aquellos entre 0.61 y 0.80 indican fuerte concordancia y aquellos entre 0.81 y 1.00 indican completa concordancia.

El estudio interlaboratorios debe llevarse a cabo al menos con 10 laboratorios obteniendo resultados sin desviaciones. Si es necesario, el analista de cada laboratorio participante debe demostrar su competencia en el uso del método alternativo y en el del método de referencia antes de participar en el estudio.

Cada laboratorio participante debe recibir el mismo número de muestras de ADN codificadas (ciego) incluyendo muestras de cepas del microorganismo objetivo y muestras de cepas de microorganismos no objetivo, un control negativo (buffer TE) y un control positivo de ADN, un templado como CAI del tamaño apropiado y reactivos para uso en PCR, incluyendo la polimerasa Taq platinum. Todas las muestras deben ser preparadas con el mismo método por ejemplo lisis celular térmica. El control positivo de ADN debe ser preparado y purificado de la cepa de referencia seleccionada y que pertenezca a una colección reconocida. Cada laboratorio debe seguir estrictamente el mismo procedimiento estándar de operación.

El cambio en el modelo del termociclador puede ser irrestringido, debe establecerse en cuantos experimentos independientes debe amplificarse cada conjunto de muestras de ADN. Los amplicones deben ser detectados por el mismo método por ejemplo electroforesis en gel de agarosa al 1.8%; los cambios en el equipo de electroforesis y el buffer pueden ser irrestringidos. Debe establecerse la intensidad del campo eléctrico por ejemplo 5 V/cm.

El cálculo debe tomar en cuenta todos los PCRs individuales de cada laboratorio participante. El criterio para la aceptación de datos generados por los laboratorios en forma individual puede ser el siguiente:

- Ambos el control positivo y el control negativo son detectados correctamente;
- el fragmento del CAI (del tamaño adecuado) es visible en el gel de agarosa de los PCRs de cepas de los microorganismos no objetivo, y
- ausencia de datos. Excluir al laboratorio que omita alguna muestra.

Los resultados de cada laboratorio participante pueden ser recopilados en una tabla como la siguiente:

No. de Laboratorio	Inclusividad (%)	Exclusividad (%)	Predictividad positiva (%)	Predictividad negativa (%)	Exactitud Analítica (%)	Índice Kappa
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
.						
.						
.						
TOTAL (promedio)						

Además, los resultados de la clasificación de las cepas utilizadas en el estudio interlaboratorios pueden ser recopilados en una tabla como la siguiente:

Cepa y designación	Clasificación correcta de cepas (%)
Cepas de microorganismos no objetivo	
.	
.	
.	
Cepas del microorganismo objetivo	
.	
.	
.	
Controles	
Negativo (Buffer TE)	
Positivo (cepa de referencia de una colección reconocida)	

Se consideran resultados falsos positivos cuando se detectan señales débiles en los geles de agarosa, indican contaminación llevada desde muestras de ADN positivas. Los resultados falsos negativos pueden ser ocasionados por la degradación de la muestra durante el transporte o el manejo durante los experimentos en algún laboratorio participante.

En conclusión esta metodología de validación permitirá determinar el par de cebadores más selectivo y a partir de él demostrar inclusividad para un amplio rango de serotipos del microorganismo objetivo y exclusividad para otras especies y géneros. Determinar la probabilidad de detección en presencia del número apropiado de copias del CAI y finalmente si el método es selectivo y robusto a través del estudio colaborativo.

Con una metodología similar, el método debe ser validado sobre muestras contaminadas natural y artificialmente para determinar la exactitud diagnóstica y la reproducibilidad. (Malorny, et.al. 2003 b)

CAPÍTULO IV

ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS

En este capítulo se presenta la propuesta para evaluar la incertidumbre del método de PCR para la detección de patógenos transmitidos por alimentos (método cualitativo) considerando que la norma ISO 17025 nos dice al respecto:

5.4.6 Estimación de la incertidumbre de medición

5.4.6.2 Los laboratorios de ensayos deben aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de medición. En algunos casos, la naturaleza del método de ensayo puede impedir el cálculo riguroso, metrológico y estadísticamente válido de la incertidumbre de medición. En estos casos, el laboratorio debe al menos, intentar identificar todos los componentes de la incertidumbre y hacer una estimación razonable y debe asegurar que la manera de informar los resultados no proporcione una impresión errónea de la incertidumbre. Una estimación razonable debe estar basada en el conocimiento del desempeño del método y del alcance de la medición y debe hacer uso, por ejemplo, de la experiencia previa y de la validación de los datos.

5.4.6.3 Cuando se esté estimando la incertidumbre de medición deben ser tomados en cuenta todos los componentes de incertidumbre que sean de importancia para la situación dada; usando métodos apropiados de análisis.

NOTA 1: Las fuentes que contribuyen a la incertidumbre incluyen, pero no necesariamente se limitan a, patrones y materiales de referencia utilizados, métodos y equipo usados, condiciones ambientales, propiedades y condiciones del elemento que está siendo ensayado o calibrado y el operador.

Y el documento de aplicación **EA-4/10** establece:

5. Incertidumbre de Medida

5.2 Los análisis microbiológicos se encuadran en la categoría de los ensayos que no permiten realizar un cálculo riguroso, metrológica y estadísticamente válido de la incertidumbre de medida. En general, puede ser apropiado basar la estimación de la incertidumbre en datos sobre la repetibilidad y la reproducibilidad exclusivamente, aunque lo ideal es incluir los sesgos (p. ej., los sesgos detectados como resultado de la participación en ensayos de aptitud). Los distintos componentes individuales de la incertidumbre deben identificarse y demostrar que están bajo control y evaluar su contribución a la variabilidad de los resultados. Algunos componentes (como los efectos del pipeteado, el pesado y las diluciones) pueden medirse directamente y evaluarse fácilmente para demostrar que realizan una contribución insignificante a la incertidumbre global. Otros componentes (como la estabilidad y preparación de las muestras) no pueden medirse directamente y su contribución tampoco puede evaluarse por métodos

estadísticos, pero su importancia en la variabilidad de los resultados debe ser también considerada.

5.4 El concepto de incertidumbre no puede aplicarse directamente a los resultados de los ensayos cualitativos como los obtenidos en los análisis de detección o en los de determinación de atributos para fines de identificación. No obstante, deben identificarse las distintas fuentes de variabilidad, como la homogeneidad de los reactivos y la interpretación de los analistas y demostrar que se controlan dichas fuentes. Los laboratorios deben conocer también la incidencia de resultados falsos positivos y falsos negativos asociada a los ensayos cualitativos que realizan.

IV.1. INCERTIDUMBRE ASOCIADA CON ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

El establecimiento de la confiabilidad de una medición depende de la determinación de dos parámetros llamados, la cantidad del analito presente y la incertidumbre asociada con la trazabilidad de esta medición a su referencia definida. Ambos son importantes, con la incertidumbre siendo el parámetro que indica el intervalo dentro del cual tenemos la seguridad de que se encuentra el valor verdadero. La incertidumbre nos indica la dispersión del resultado. (Love, et.al. 2006)

La estimación de la incertidumbre ha sido descuidada en muchas áreas del análisis, pero esto está cambiando con la acreditación de los laboratorios basada en la norma internacional ISO/IEC 17025. Muchos progresos se han obtenido en el desarrollo de investigaciones para la estimación de la incertidumbre dentro de la medición química, por ejemplo la Guía Eurachem para la cuantificación de la incertidumbre en mediciones analíticas (Eurachem 2000) y más recientemente para la microbiología tradicional (Niemelä, 2002; Forster, 2003) citados en Love, et.al. 2006.

Estimar la incertidumbre no es sencillo y debe intentarse una vez que se tiene buen entendimiento del proceso. Antes de realizar cualquier intento para estimar la incertidumbre del método es importante que el método haya sido validado apropiadamente. Sin la validación es imposible obtener resultados confiables o una estimación confiable de la incertidumbre de los resultados.

En la práctica de los laboratorios microbiológicos se pueden identificar muchas causas de variabilidad, por ejemplo:

- La habilidad de un aislamiento para dar las reacciones típicas sobre un medio diagnóstico,
- el uso de ingredientes incorrectos en un medio de cultivo,
- las consecuencias del cambio de marca de un medio de cultivo comercial,
- el uso de condiciones no estandarizadas en la preparación, esterilización y empleo de medios de cultivo,
- errores humanos y del equipo en el pesado, pipeteado y otras actividades de laboratorio,
- la tolerancia aplicada a la vida útil de los reactivos de la prueba,
- los niveles relativos de habilidad de los diferentes analistas, etc.

Estos son algunos ejemplos de sesgos biológicos, instrumentales y del personal que afectan la exactitud, precisión y por lo tanto la incertidumbre de pruebas microbiológicas. Interpretar adecuadamente los resultados obtenidos de algún procedimiento analítico ya sea físico, químico o biológico, requiere la consideración de diversas fuentes del error actual y potencial asociado con los resultados obtenidos. Cualquier resultado analítico es influenciado por un total de tres fuentes principales de error:

- Errores aleatorios, asociados con la matriz de la muestra original, la muestra analítica, el medio de cultivo, etc.;
- Errores sistemáticos inherentes asociados con el procedimiento analítico y;
- Modificaciones de los errores sistemáticos debidos a las condiciones ambientales y equipamiento de un laboratorio en particular junto con los rasgos del personal analista que lleva a cabo el procedimiento de prueba. (AOAC International, 2006)

Exactitud y Precisión

Exactitud es definida (ISO 3534-2:2006) como “el grado de cercanía entre un resultado de prueba o un resultado de medida y el valor verdadero”. Exactitud es una combinación de veracidad y precisión (una combinación de los componentes aleatorios y el error sistemático).

Exactitud es esencialmente “ausencia de error”. Es importante hacer notar que el término exactitud aplica solamente a los resultados y no puede ser aplicado a métodos, equipo, material general de laboratorio entre otros.

Veracidad es definida (ISO-3534-2:2006) como “el grado de cercanía entre el valor promedio obtenido de una serie de resultados de prueba y un valor de referencia aceptado”. Es equivalente a una ausencia de sesgos, es una medida del error sistemático total pero no del aleatorio.

Veracidad, a diferencia de exactitud, podría ser contrastada con precisión.

Precisión es definida como “el grado de cercanía entre resultados de prueba independientes bajo condiciones establecidas”. Depende solamente de la distribución de errores aleatorios y no está relacionada a un valor verdadero o especificado.

La medida de la precisión usualmente es expresada en términos de imprecisión y calculada como una desviación estándar de los resultados de la prueba. Una baja precisión es reflejada por una alta desviación estándar.

Medidas cuantitativas de precisión dependen de manera crítica de las condiciones estipuladas. Condiciones de repetibilidad y reproducibilidad son conjuntos particulares de condiciones extremas estipuladas (ISO-3534-2:2006).

Incertidumbre de la medición

- Para datos cuantitativos (por ejemplo: conteo de colonias, Número Más Probable, etc) una medida de la incertidumbre podría ser algún parámetro estadístico apropiado asociado con el resultado de la prueba. Tales parámetros incluyen la desviación estándar, el error estándar de la media o un intervalo de confianza alrededor de la media. (AOAC International, 2006)

Medidas de repetibilidad y reproducibilidad son las piedras angulares de la estimación de la incertidumbre analítica. Y son definidas (ISO 21748:2010) como:

Repetibilidad “es una medida de la variabilidad derivada bajo condiciones de repetibilidad especificadas” por ejemplo: resultados independientes de prueba son obtenidos con el mismo método, en el mismo laboratorio, por el mismo analista usando el mismo equipo, lote de medios de cultivo y diluyentes, y realizados dentro de un intervalo corto de tiempo.

Reproducibilidad “es una medida de precisión derivada bajo condiciones de reproducibilidad” por ejemplo: resultados de prueba obtenidos con el mismo método en diferentes laboratorios, con diferentes analistas, usando diferente equipo. Un estado válido de reproducibilidad requiere la especificación o el establecimiento de las condiciones empleadas.

Reproducibilidad intermedia (ISO 5725-2:1994) es definida como “una medida de reproducibilidad derivada bajo condiciones de reproducibilidad dentro de un solo laboratorio”.

Incertidumbre típica combinada μ_c es la desviación típica estimada asociada al resultado, y es igual a la raíz cuadrada positiva de la varianza combinada, obtenida a partir de todas las varianzas y covarianzas, como quiera que hayan sido evaluadas utilizando la llamada ley de propagación de la incertidumbre.

Incertidumbre expandida U , se obtiene cuando la incertidumbre típica combinada μ_c se multiplica por un factor de cobertura k . El propósito de esta incertidumbre expandida U es proporcionar un intervalo de confianza para repetibilidad y reproducibilidad entorno al valor medio. La elección del factor k habitualmente comprendido entre los valores 2 y 3, se fundamenta en la probabilidad o nivel de confianza requerido para el intervalo.

Para datos cualitativos (por ejemplo: pruebas de presencia o ausencia) la incertidumbre medida no puede ser derivada de la misma manera, varias son las formas en las que se ha expresado este parámetro universal para evaluar la calidad. Walter Bich y Francesca Pennechi usan la distribución de Poisson para estimar la incertidumbre en las medidas por conteo. Para estimar la probabilidad se han usado métodos Bayesianos. En el 2002, con la finalidad de encontrar una equivalencia con las medidas cualitativas y lo que la ISO 5725 propone para los estudios de precisión en medidas cuantitativas Langton propuso el equivalente cualitativo de repetibilidad un término denominado acordancia (accordance) y el equivalente de reproducibilidad concordancia (concordance) en estudios colaborativos de medidas cualitativas en métodos microbiológicos. Posteriormente en el 2004 Hilko Van Der Voet y Leo W.D. usan estos términos para un estudio colaborativo de microbiología de alimentos y en el 2010 Wilrich aplica los mismos términos en otro estudio de intercomparación. (Olvera y Valencia, 2012)

El documento JCGM 100: 2008 establece las reglas generales para evaluar y expresar la incertidumbre de las medidas de tipo cuantitativo y el documento ISO 5725-3: 1994 es una norma auxiliar para estimar la precisión intermedia a través de la expresión de la repetibilidad y la reproducibilidad también para medidas cuantitativas.

AENOR recomienda a través de su documento: Estimación de la incertidumbre. Medidas y ensayos, expresar la incertidumbre mediante estudios de precisión en los casos en los que no se puede modelar el proceso tal y lo entiende la Ley de propagación de incertidumbres. (Olvera y Valencia, 2012)

IV.2. MÉTODO DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS: INCERTIDUMBRE DE MEDIDA

El método de PCR para la detección de patógenos transmitidos por alimentos es un método con un resultado cualitativo que tiene una respuesta binaria presencia o ausencia de una banda visible correspondiente al fragmento de ADN del microorganismo objetivo del tamaño adecuado, sin embargo a lo largo del método están involucrados valores numéricos.

En este trabajo se propone evaluar la contribución a la incertidumbre de la medición de aquellas fuentes relacionadas con valores numéricos siguiendo la metodología propuesta por JCGM 100: 2008 y además evaluar la incertidumbre en la decisión final del resultado (presencia/ausencia) basándose en la recomendación de AENOR y en la propuesta de Langton (2002) del uso de estadísticos para estimar la acordancia y concordancia para expresar la incertidumbre de medidas cualitativas donde el resultado es una respuesta binaria.

IV.2.1. Fuentes de Incertidumbre

Las fuentes de incertidumbre en PCR cualitativo para la detección de patógenos transmitidos por alimentos se representan en un diagrama causa y efecto en la Figura 1. Los parámetros más críticos son: la calidad del templado de ADN (integridad física del cromosoma, ausencia o presencia de inhibidores de PCR), diferencias por lote en la pureza de los reactivos, errores de pipeteado, exactitud en la duración de los tiempos y valores de temperatura en la etapa de amplificación y variaciones en el funcionamiento del termociclador.

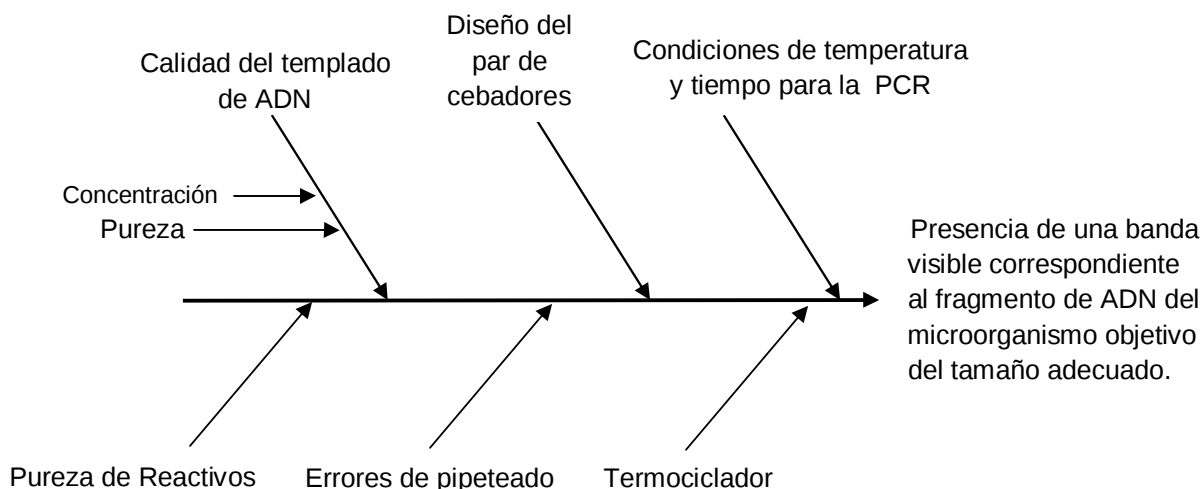


Figura 1. Diagrama causa y efecto para las principales fuentes de incertidumbre en PCR cualitativo para la detección de patógenos transmitidos por alimentos.

De las fuentes de incertidumbre representadas en el diagrama causa y efecto se puede observar que de las que se puede cuantificar su contribución a la incertidumbre global del método están relacionadas básicamente con los instrumentos y equipos de medición utilizados (espectrofotómetro, micropipetas y el termociclador) por lo tanto se consideran fuentes de incertidumbre tipo B de acuerdo con la Guía JCGM 100: 2008, y son cuantificadas usando información externa u obtenida por experiencia. Estas fuentes de información pueden ser:

- Certificados de calibración.
- Manuales del instrumento y equipo de medición, especificaciones.
- Normas o literatura.
- Valores de mediciones anteriores.
- Comportamiento sobre las características o el comportamiento del sistema de medición.

La cuantificación de una fuente de incertidumbre incluye la asignación de un valor y la determinación de la distribución a la cual se refiere este valor. Las distribuciones que aparecen más frecuentemente son:

a) Distribución normal

Los resultados de una medición repetida afectada por una o más magnitudes de influencia que varían aleatoriamente, generalmente siguen en buena aproximación una distribución normal. También la incertidumbre indicada en certificados de calibración se refiere generalmente a una distribución normal.

b) Distribución rectangular

En una distribución rectangular cada valor en un intervalo dado tiene la misma probabilidad, o sea la función de densidad de probabilidad es constante en este intervalo. Ejemplos típicos son la resolución de un instrumento digital o la información técnica sobre tolerancias de un instrumento. En general, cuando exclusivamente hay conocimiento de los límites superior e inferior del intervalo de variabilidad de la magnitud de entrada, lo más conservador es suponer una distribución rectangular.

c) Distribución triangular

Si además del conocimiento de los límites superior e inferior hay evidencia de que la probabilidad es más alta para valores en el centro del intervalo y se reduce hacia los límites, puede ser más adecuado basar la estimación de la incertidumbre en una distribución triangular.

IV.2.2. Cuantificación de las fuentes de incertidumbre

La calidad del templado de ADN está basada en su concentración y pureza. Ambas pueden determinarse por métodos espectrofotométricos. (Torres, 2011)

La concentración y pureza de las muestras de ADN son determinadas fácilmente aprovechando la capacidad que tienen los ácidos nucleicos de absorber la luz ultravioleta con un pico máximo de absorción a 260 nm. La medición de la absorbancia a esta longitud de onda permite el cálculo directo de la concentración en una muestra:

$$[\text{ADN}] \mu\text{g/ml} = A_{260} \times \text{dilución} \times 50.0$$

en donde: A_{260} = Absorbancia a 260 nm (en densidades ópticas)

dilución = Factor de dilución empleado

50.0 = Coeficiente de extinción del ADN

El coeficiente de extinción de un compuesto se refiere a una medida de la absorción de luz en un medio. En química, el coeficiente de extinción de masa (también llamado coeficiente de absorción de masa) y el coeficiente de extinción molar son parámetros que definen cuánta luz absorbe una sustancia a una determinada longitud de onda, por unidad de masa o por concentración molar, respectivamente. Las diluciones se pueden hacer con agua o con buffer TE (Tris, EDTA) y el espectrofotómetro debe ajustarse a cero con un blanco.

Es importante tomar en cuenta que estas mediciones reflejan la cantidad total de ácidos nucleicos en una muestra y no la cantidad relativa de un solo componente tal como ADN o ARN en la muestra.

Los cálculos basados en la $A_{260\text{nm}}$ proporcionan poca información acerca de la calidad y pureza de la muestra; en la presencia de un exceso de sales, proteínas contaminantes y/o acarreamiento de solventes orgánicos, el valor de la absorbancia puede variar significativamente. Por esta razón, es importante realizar el cálculo de la "relación 260/280" (A_{260} / A_{280}) lo cual proporciona un valor razonable de la pureza de la muestra. Una muestra de ADN pura tiene una relación A_{260} / A_{280} con valor de 1.8 ± 0.15 . Variaciones fuera de este rango generalmente indica contaminantes.

Aunque el valor obtenido en la relación 260/280 de una muestra es un buen indicador de su calidad, también es de suma importancia examinar el espectro de absorción (Figura 2); usualmente entre 240 y 320 nm. Muestras de ácidos nucleicos puras producirán una curva de campana sesgada característica (Figura 2) la cual exhibe la máxima absorbancia alrededor de 260 nm. Las muestras de ácidos nucleicos de alta pureza manifiestan un perfil de absorción con una pendiente positiva debajo de 260 nm y una pendiente negativa por arriba de 260 nm. (Torres, 2011).

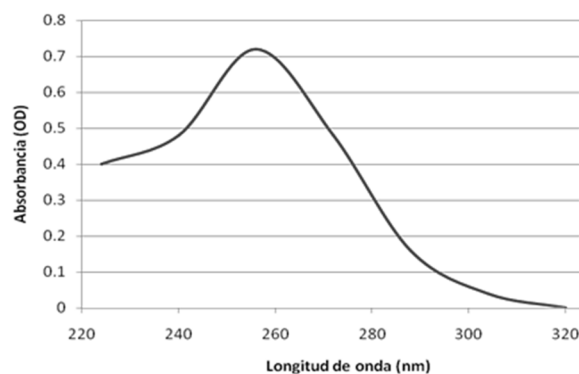


Figura 2. Espectro de absorción de ácidos nucleicos (Torres, 2011)

El espectrofotómetro que se utilice tiene que ser calibrado y debe conocerse el intervalo de aceptación para absorbancia así como la legibilidad.

De la misma manera para las micropipetas y el termociclador se obtiene de los certificados de calibración un criterio de aceptación/rechazo (en el caso de las micropipetas para cada volumen ya sea pequeño o grande).

Para todos los equipos e instrumentos de medición, la incertidumbre calculada tendrá una distribución rectangular y se calcula de la siguiente manera:

Si la magnitud de entrada X_i tiene una distribución rectangular con el límite superior a_+ y el límite inferior a_- , el mejor estimado para el valor de X_i está dado por:

$$x_i = \frac{a_+ + a_-}{2}$$

y la incertidumbre estándar se calcula por:

$$\mu(x_i) = \frac{a_+ - a_-}{\sqrt{12}}$$

Una aplicación típica es la resolución de un instrumento digital. También la incertidumbre relacionada con el número finito de cifras significativas de datos tomados de la literatura puede ser tratada con esta distribución.

Combinación

El resultado de la combinación de las contribuciones de todas las fuentes es la incertidumbre estándar combinada $\mu_c(y)$, la cual contiene toda la información esencial sobre la incertidumbre del analito (mensurando) Y .

La contribución $\mu_i(y)$ de cada fuente a la incertidumbre combinada depende de la incertidumbre estándar $\mu(x_i)$ de la propia fuente y del impacto de la fuente sobre el analito (mensurando). Es posible encontrar que una pequeña variación de alguna de las magnitudes de influencia tenga un impacto importante en el analito (mensurando) y viceversa.

Se determina $\mu_i(y)$ por el producto de $\mu(x_i)$ y su coeficiente de sensibilidad c_i (o factor de sensibilidad):

$$\mu_i(y) = c_i \cdot \mu(x_i)$$

La incertidumbre combinada $\mu_c(y)$ se calcula por la suma geométrica de las contribuciones particulares:

$$\mu_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N [c_i \cdot \mu(x_i)]^2}$$

La expresión anterior es la llamada Ley de propagación de incertidumbre.

IV.2.3. Incertidumbre en la toma de decisión

Los conceptos de repetibilidad y reproducibilidad son ampliamente utilizados en el análisis de datos de estudios colaborativos en microbiología cuantitativa e indican en qué grado los resultados pueden ser repetidos o reproducidos ya sea correctamente o no.

La principal limitación de repetibilidad y reproducibilidad es que solamente son aplicables a datos cuantitativos y no pueden ser aplicados en análisis cualitativos como por ejemplo los métodos de detección. Esto se debe a que ambos parámetros son expresados en términos de la probable diferencia entre dos resultados de la prueba; claramente esto no tiene sentido para datos cualitativos en donde dos resultados pueden ser iguales o diferentes. (Langton, et.al. 2002)

Por lo tanto el empleo de dos nuevos parámetros “Acordancia” (Accordance) y “Concordancia” (Concordance) considerados análogos a repetibilidad y reproducibilidad serán utilizados.

Acordancia es el grado de cercanía entre resultados; es decir, cuando dos materiales idénticos de prueba analizados por el mismo laboratorio bajo condiciones de repetibilidad dan el mismo resultado (ya sea ambos positivos o ambos negativos).

La acordancia es reconocida con la letra $\hat{A}_i$ y se define para datos balanceados como el cociente del número de pares idénticos dentro del laboratorio y el número de posibles pares dentro del laboratorio. (Langton, et.al. 2002)

$$\hat{A}_i = \frac{NIP}{NPP}$$

NIP= número de pares idénticos dentro del laboratorio

NPP= número de posibles pares dentro del laboratorio

$NIP = k_i (k_i - 1) + (n - k_i) (n - k_i - 1)$

$NPP = n (n-1)$

n = número de experimentos por cada laboratorio

k_i = número de experimentos obtenidos en el laboratorio con resultados positivos

La acordancia global estimada corresponde al promedio de las acordancias estimadas para cada laboratorio.

$$\hat{A} = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L \frac{k_i (k_i - 1) + (n - k_i) (n - k_i - 1)}{n (n-1)}$$

L corresponde al número de laboratorios involucrados en el experimento

Para una interpretación de precisión intermedia L corresponde al número de analistas involucrados en el experimento, n corresponde al número de experimentos por cada analista y k el número de experimentos obtenidos por cada analista con resultados positivos. (Olvera y Valencia, 2012)

Concordancia es el equivalente de reproducibilidad y se describe como el grado de oportunidad de que dos materiales idénticos de prueba enviados a diferentes laboratorios darán el mismo resultado (ya sea ambos positivos o ambos negativos).

La manera más intuitiva de calcular la concordancia es simplemente enumerar todos los posibles apareamientos que se den con los datos entre laboratorios.

La concordancia es el porcentaje de todos los apareamientos dando el mismo resultado, se reconoce con el símbolo $\hat{C}$ y puede ser estimada a partir de la acordancia

$$\hat{C} = \frac{2r(r - nL) + nL(nL - 1) - \hat{A}nL(n-1)}{n^2 L(L - 1)}$$

n= número de experimentos por cada laboratorio

L= número de laboratorios involucrados en el experimento

$\hat{A}$ = Acordancia

r = número total de experimentos obtenidos en todos los laboratorios con resultados positivos.

Para una interpretación de precisión intermedia, L corresponde al número de analistas involucrados en el experimento, n corresponde al número de experimentos por cada analista y r se interpreta como el número de experimentos obtenidos con resultados positivos por todos los analistas. (Olvera y Valencia, 2012)

Se propone realizar un estudio de precisión intermedia para variables cualitativas en donde participan los analistas de un laboratorio por ejemplo 5 analistas que hacen la prueba, cada analista repite 5 veces la misma muestra y se estima la acordancia y concordancia.

En el capítulo de validación se describió el procedimiento para calcular la exactitud analítica de un método de PCR para la detección de patógenos transmitidos por alimentos que involucra el empleo de cepas puras y se detalla cada una de las etapas del método.

Para estimar acordancia y concordancia se describe el procedimiento general del método de PCR para una muestra de alimento contaminada (de manera artificial) con un microorganismo patógeno que debería seguir cada uno de los cinco analistas seleccionados y hacer 5 replicados del análisis de la muestra.

Algunos de los pasos del método ya no serán tratados a detalle en virtud de que ya fueron descritos en el capítulo de validación.

El estudio de precisión intermedia inicia cuando cada analista recibe la muestra de 1 mL codificada (ciego); además de un control positivo de ADN de una cepa de referencia del microorganismo objetivo (perteneciente a una colección reconocida), un control de amplificación interno (producto de PCR del tamaño adecuado), el par de cebadores seleccionado (dependiendo del microorganismo en cuestión), la polimerasa Taq platinum, buffer apropiado, dNTPs y el procedimiento de operación estándar detallado para el tratamiento pre-PCR y el ensayo PCR.

A continuación se describe de manera generalizada el procedimiento para la preparación de las muestras por parte del laboratorio organizador, se debe tener en cuenta que las condiciones pueden variar dependiendo del microorganismo en cuestión.

Preparación del inóculo

Debe elegirse una cepa de referencia del microorganismo objetivo (patógeno) que pertenezca a una colección reconocida, debe estar bien caracterizada (molecularmente y por perfiles de resistencia a antibióticos), además de conocerse y estar documentado los alimentos o materiales de los cuales fue aislada. Los cultivos que serán utilizados de esta cepa deben cultivarse aeróbicamente en agua peptonada a 37°C hasta la fase exponencial y diluirlos apropiadamente (diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} en cloruro de sodio al 0.9% m/v).

Mediante siembra en placa de cada una de 3 concentraciones celulares sobre el agar correspondiente (dependiendo del microorganismo) se realiza conteo celular viable. Las placas deben incubarse a 37°C durante 24 horas. La concentración celular de cada dilución es estimada calculando el número promedio de unidades formadoras de colonias (UFC) de 5 placas de agar para cada dilución. (Malorny, et.al. 2004)

Las mismas diluciones se toman como inóculo para las muestras.

Preparación de las muestras de prueba

Seleccionar el alimento y realizar un enjuague (de la porción completa del alimento) en una bolsa de plástico estéril utilizando agua peptonada a 4°C. Enjuagar manualmente con agitación suave durante 1 minuto. Del enjuague se toma una alícuota de 100 mL con el fin de verificar la ausencia de contaminantes naturales con el microorganismo objetivo. La suspensión restante de agua peptonada debe repartirse en alícuotas de 100 mL. Una alícuota se deja sin inocular, una se inocula con 1 mL de la dilución celular 10^{-7} (aprox. 1-10 UFC/100 mL nivel bajo de inoculación), una con 1 mL de la dilución celular 10^{-6} (aprox. 10-100 UFC/100 mL nivel medio de inoculación) y una con 1 mL de la disolución celular 10^{-5} (aprox. 100-1000 UFC/100 mL nivel alto de inoculación) de la cepa de referencia.

Después de la inoculación debe realizarse un paso de pre-enriquecimiento a 37°C durante 20 horas. Las muestras de prueba pre-enriquecidas deben repartirse en alícuotas de 1 mL y almacenarse a -30°C hasta que sean entregadas a los analistas. (Malorny, et.al. 2004)

Método realizado por cada analista

A cada uno de los cinco analistas participantes se les entrega una alícuota sin inocular y una alícuota de 1 mL de cada una de los niveles de inoculación, pre-enriquecidas y congeladas.

Con el fin de evitar contaminación cruzada las muestras de cada nivel de inoculación deben ser analizadas separadamente por cada analista, el análisis de cada nivel de inoculación deberá ser repetido cinco veces por cada analista.

Las muestras pre-enriquecidas congeladas deben ser descongeladas por el analista (cada una en el momento que se utilice); y se debe realizar la extracción de ADN mediante el método de operación establecido.

Cinco alícuotas de 5 μ L cada una del sobrenadante deben ser usadas directamente como templado de ADN en la reacción de PCR.

Para el ensayo de PCR debe realizarse una mezcla típica de 25 μ L como se describió anteriormente en el capítulo de validación además se debe incluir el control de amplificación interno con el número de copias y el tamaño apropiado y los 5 μ L del templado de ADN, el analista debe realizar este procedimiento cinco veces.

Las condiciones de incubación deben estar establecidas en el procedimiento de operación.

Los productos de PCR pueden ser detectados por electroforesis en gel de agarosa al 1.8% (debe establecerse el voltaje y tiempo de corrida), deben ser teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV. (Malorny, et.al. 2004)

Los resultados de cada analista deben ser recopilados para el análisis de precisión intermedia en una tabla como la siguiente:

		Presencia del amplicón objetivo (número de resultados positivos)						
		Número de analista participante						
Nivel de inoculación de la muestra	Esperado	1	2	3	4	5	Acordancia	Concordancia
Sin inocular	0							
Bajo (1-10 UFC/100mL)	5							
Medio (10-100UFC/100mL)	5							
Alto (100-1000UFC/100mL)	5							

La propuesta de acordancia y concordancia mide la cercanía de los resultados obtenidos por cada analista y entre analistas, entre más se acerquen a 1 los resultados de acordancia y concordancia nos da un mayor valor de precisión.

Estimar la incertidumbre en medidas de tipo cualitativo no está claro. Si se expresa en función de los términos Acordancia y Concordancia se estima la repetibilidad y la reproducibilidad de los analistas del laboratorio pero se ignoran las fuentes de incertidumbre en el momento de la medición. Si se estima la incertidumbre de acuerdo a la guía JCGM 100: 2008 es posible aplicar el modelo solamente para el equipo involucrado (incertidumbre tipo B) pero no se incluye la toma de decisión.

CAPÍTULO V

TRAZABILIDAD EN EL MÉTODO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS

V.1. TRAZABILIDAD

Los estándares de calidad como la norma ISO 17025 enfatizan la necesidad de personal competente, métodos validados, sistemas de calidad comprensivos y una trazabilidad apropiada a las referencias de medición.

La trazabilidad es una de las principales herramientas requeridas para la comparación. El vocabulario internacional para metrología (VIM) define trazabilidad como la:

“Propiedad del resultado de una medición o valor de un estándar por medio del cual este puede ser relacionado a estándares de referencia, usualmente estándares nacionales o internacionales a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones todas teniendo incertidumbres declaradas”.

La habilidad de comparar los resultados significativamente donde quiera que estos se originen es provista entre otras cosas por la trazabilidad a un consistente y determinado acuerdo de unidades y escalas de medición.

A continuación se declara un grupo de actividades que son necesarias para establecer la trazabilidad en un laboratorio de ensayo:

- I. Especificar el analito (mensurando) y la incertidumbre aceptable.
- II. Elegir el método o procedimiento de medición apropiado.
- III. Demostrar a través de la validación que en el método se controlan todas las cantidades o magnitudes que influyen significativamente el resultado o el valor asignado a un estándar.
- IV. Identificar la importancia relativa de cada cantidad de influencia.
- V. Escoger y aplicar estándares de referencia apropiados.
- VI. Estimar la incertidumbre.

Esta lista no implica necesariamente un orden o prioridad entre las actividades, todas son importantes.

La validación es considerada como clave en el establecimiento de la trazabilidad. No es una actividad opcional, incluso cuando se adopta un método estándar que ha sido validado y minuciosamente probado, algunos niveles de validación quedan necesariamente. Los métodos de análisis son complejos y consecuentemente propensos al error humano; es invariablemente necesario que por lo menos se verifique que el laboratorio puede llevar a cabo el método correctamente, esto se realiza mejor con un apropiado material de referencia certificado.

V.2. TRAZABILIDAD EN LOS LABORATORIOS MICROBIOLÓGICOS

Para la calibración de los aparatos de laboratorio, para la evaluación de un método de medida o para la asignación de valores materiales existen los llamados materiales de referencia, que son materiales o sustancias que sirven para ello, por ser claramente homogéneos y estar claramente establecidos. A ellos hay que referirse o hay que usarlos para un trabajo correcto en los laboratorios. En las técnicas microbiológicas existen, por lo tanto, las cepas de referencia, que son los microorganismos obtenidos de una colección nacional o internacional reconocidas, como es la American Type Culture Collection (ATCC) y the National Center for Type Cultures (NCTC). Un servicio muy importante de las colecciones de cultivos es proporcionar no sólo cepas microbianas, útiles para muchas cosas, sino que, dentro de las cepas que suministran las colecciones están las cepas de referencia, que sirven para demostrar la trazabilidad del laboratorio. (Uruburu, 1999)

Los materiales de referencia deben cumplir tres requisitos:

1. **Estabilidad.** En Microbiología quiere decir que las células microbianas puedan crecer. Por eso las colecciones suministran las cepas con las instrucciones para su recuperación.
2. **Homogeneidad.** En Microbiología quiere decir que se trata de un cultivo puro.
3. **Valor de la propiedad.** En Microbiología quiere decir que se trata de una cepa microbiana auténtica.

Curiosamente estos tres requisitos coinciden con las tres finalidades que se persiguen con un buen método de conservación de cepas microbianas, es decir, se deben guardar las cepas vivas, puras y genéticamente estables. Por lo tanto, los dos primeros requisitos de un material de referencia, que son los dos primeros objetivos de un buen método de conservación, son fáciles de cumplir si se poseen los conocimientos básicos en Microbiología. Pero el tercer requisito y tercer objetivo es muy difícil de conseguir, ya que es conocida la facilidad con que una cepa microbiana cambia sus características con los subcultivos que de ella se van haciendo. Por eso los métodos de conservación son tanto mejores cuanto más se evita el crecimiento de la cepa que se guarda y en las recomendaciones para un trabajo microbiológico correcto, se habla de la diferencia entre cepas de reserva y cepas de trabajo. El laboratorio debe manejar las cepas siguiendo las recomendaciones de las normas correspondientes para asegurar la calidad de su trabajo y sobre todo debe conservar la cepa adecuadamente (por congelación o liofilización, si es posible), controlar su pureza y que no haya perdido las características propias de la misma. (Uruburu, 1999)

Lo anteriormente expuesto nos lleva a una conclusión muy importante en Microbiología; cada cepa de una colección es única, lo cual quiere decir que los resultados de trabajos de microbiología realizados en diferentes laboratorios en distintos momentos y utilizando cepas que tienen un mismo número en una colección, sólo son comparables entre sí si los cultivos se obtuvieron de esa colección. Si una cepa de colección se consigue por cualquier vía que no sea la propia colección, no se puede mencionar utilizando el número que tienen en esa colección, sino solamente como derivada de la cepa de la colección.

Una misma cepa puede ser referenciada para muchas cosas, puede ocurrir que una cepa se hace inadecuada para un determinado uso, sin haber perdido las características que la hacen adecuada para otros y muchas veces las colecciones ignoran algunos de los usos de la cepa y por lo tanto no pueden controlar su autenticidad.

El problema de autenticidad de una cepa de referencia se complica aún más cuando se solicita a la colección que certifique la cepa. En este caso, la cepa de referencia sería un material de referencia certificado, es decir, el material de referencia en cuestión acompañado de un certificado en el cual uno o más valores de sus propiedades han sido certificadas mediante un procedimiento que establece su trazabilidad con una realización exacta de la unidad en que se expresan los valores de dichas propiedades. Pero en este caso el material de referencia es un material biológico y surge entonces la dificultad en la certificación. Una colección de cultivos puede certificar solamente que ha suministrado una determinada cepa, después de comprobar que se trata de un cultivo puro y que al haberse conservado la cepa con todo cuidado y haberla caracterizado por las pruebas morfológica, bioquímicas y moleculares adecuadas, es difícil que se haya producido un cambio genético en sus propiedades, cosa que puede ocurrir con relativa frecuencia en microbiología.

Un certificado de origen o de calidad debe certificar lo más posible la autenticidad de la cepa, solamente hasta el momento en que se envía al usuario. Si este cumple con todas las recomendaciones de la metodología microbiológica, se habrá asegurado casi totalmente la calidad microbiológica de su trabajo. (Uruburu, 1999)

Según se establecen las directrices contenidas en la norma ISO 11133-1, las cepas de referencia podrán ser subcultivadas una vez para obtener cepas de reserva, realizando en paralelo los controles de pureza y ensayos bioquímicos que sean necesarios. Si las cepas de reserva se han descongelado, no deben volver a congelarse y reutilizarse.

Las cepas de trabajo no deben ser subcultivadas salvo que así se requiera y se defina en un método normalizado o que el laboratorio pueda aportar evidencias documentadas de que no se ha producido ningún cambio en ninguna propiedad importante.

Las cepas de trabajo no deben ser subcultivadas para sustituir las cepas de reserva. Los derivados comerciales de las cepas de referencia pueden utilizarse sólo como cepas de trabajo. (Eurachem/EA Guide 04/10, 2002)

V.3. MÉTODO DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS: TRAZABILIDAD

Se propone demostrar la trazabilidad para el método de PCR para la detección de patógenos transmitidos por alimentos a través de las cepas de referencia requeridas en el procedimiento de validación y de la trazabilidad de los equipos críticos, logrando entonces la trazabilidad del conjunto equipo-método de ensayo.

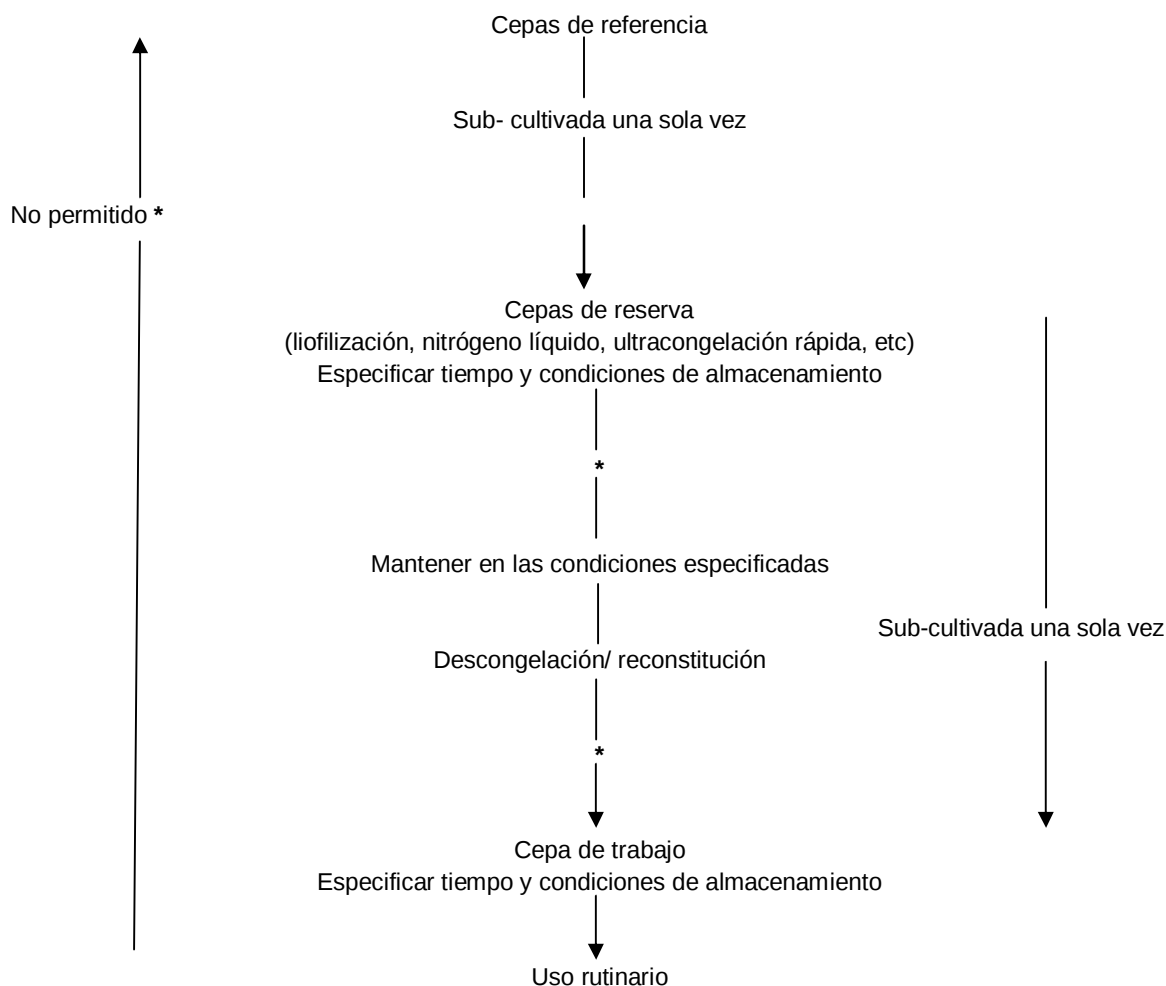
En el capítulo de validación se menciona que el límite de detección del método basado en PCR puede ser determinado en relación al cálculo de la probabilidad de detección; de esta manera puede establecerse la frecuencia relativa esperada de una respuesta positiva de PCR a varias concentraciones de ácidos nucleicos objetivo o células.

Debe entonces seleccionarse una cepa de referencia que pertenezca a una colección reconocida y siguiendo el procedimiento descrito en la validación utilizar ADN purificado de la cepa de referencia en un rango de concentraciones celulares (10^5 a 10^0 por ejemplo) y de ADN usando el conjunto primer que haya resultado ser el más selectivo y en presencia del número adecuado de copias del control de amplificación interno para determinar la probabilidad de detección.

V.3.1 Cepas de referencia

Como en las metodologías oficiales de microbiología se suelen citar las cepas de referencia con los números que tienen éstas en la American Type Culture Collection de los Estados Unidos (ATCC), quiere decir que estrictamente solo puede ser la ATCC la que suministre las cepas de referencia. Pero en la práctica esto no es así y todas las colecciones tienen las mismas cepas de referencia que han obtenido a través de diferentes vías y los usuarios consiguen su cepa de referencia a partir de muchas y variadas colecciones, aunque las piden con los números de la ATCC.

A continuación se presenta la metodología para la utilización general de cepas de referencia:



*Deben realizarse los controles paralelos de pureza y los ensayos bioquímicos que sean necesarios.

Todas las fases del proceso deben estar perfectamente documentadas y debe mantenerse un registro detallado de todas las operaciones realizadas. (Eurachem/EA Guide 04/10, 2002)

Respecto al equipo e instrumentos de medición críticos en el método de PCR, como ya se mencionó en el capítulo de incertidumbre se encuentran las micropipetas (pipetas de pistón), el espectrofotómetro y el termociclador de los cuales se establece la trazabilidad de las mediciones de la siguiente manera:

V.3.2. Micropipetas (pipetas de pistón)

Las micropipetas consideradas como recipientes volumétricos se calibran por el método gravimétrico y la determinación de la trazabilidad se realiza en base a la Guía Técnica Sobre Trazabilidad e Incertidumbre en los Servicios de Calibración de Recipientes Volumétricos por el Método Gravimétrico elaborada por el CENAM.

En la calibración de micropipetas, la magnitud sujeta a medición es el volumen a la temperatura de referencia (20°C) y el método de medición es el método gravimétrico, en

donde se determina la masa de agua destilada a partir de la diferencia del peso de la masa del recipiente vacío y el peso de la masa del recipiente con agua; se registran la temperatura ambiental, la temperatura del agua, la presión atmosférica y la humedad relativa, para realizar la evaluación del volumen a la temperatura de referencia. La densidad del agua destilada se conoce en función de la temperatura del agua.

El procedimiento de medición aplicable al método gravimétrico se resume en los siguientes puntos:

1. Acondicionamiento a la temperatura de prueba del recipiente y de los equipos a la temperatura del laboratorio donde se realiza la calibración.
2. Determinación de la masa del agua.
3. Registro de la temperatura del agua.
4. Registro de las condiciones ambientales.
5. Cálculo del volumen.
6. Resultados de la medición y estimación de incertidumbre.

Las micropipetas se calibran en por lo menos tres puntos que son: el volumen nominal, 50% del volumen nominal y el 10% del volumen nominal.

Los equipos e instrumentos necesarios para realizar la calibración de micropipetas son:

- Balanza, con certificado de calibración emitido por un laboratorio acreditado y con una resolución de al menos 1/10 de la tolerancia del instrumento de acuerdo a la norma ISO 4787:2010 y para micro volúmenes de acuerdo a la norma ISO-8655-6:2002.
- Termómetro. El termómetro para medir la temperatura del agua debe contar con calibración por un laboratorio acreditado y resolución de 0,1°C o mejor. El termómetro para medir la temperatura del aire debe contar con calibración vigente por un laboratorio acreditado y resolución de 1°C o mejor.
- Barómetro. El barómetro debe contar con calibración por un laboratorio acreditado, con una resolución de 100 Pa o mejor.
- Higrómetro. El higrómetro debe contar con calibración vigente por un laboratorio acreditado, con una resolución de 10% o mejor.
- Agua. El agua utilizada en las calibraciones debe ser destilada o deionizada (grado 3) según la norma ISO 3696:1995.

Las instalaciones donde se realizan las mediciones deben contar con un sistema de control de temperaturas adecuado, tal que garantice una estabilidad de temperatura de $\pm 0,5$ °C en una hora, cuando se calibran volúmenes desde 1 μ L y hasta 5 L.

Las balanzas deben encontrarse situadas en un lugar libre de vibraciones y corrientes de aire.

Por lo tanto, los instrumentos y equipos de medición que deben estar calibrados con trazabilidad a patrones nacionales, para llevar a cabo calibraciones de volumen por el método gravimétrico son:

1. Balanza
2. Termómetro
3. Higrómetro
4. Barómetro

Para asegurar que la trazabilidad de un resultado de medición o del valor de un patrón se mantiene, es indispensable tener un registro de los tiempos de calibración y vigencia de la calibración que garanticen el buen funcionamiento de los instrumentos y equipos y una incertidumbre confiable. La trazabilidad de los patrones, instrumentos y equipos de medición es a patrones nacionales.

La forma de garantizar el estado de calibración de los instrumentos, equipos o patrones entre calibración y calibración es a través de la verificación periódica de los valores registrados en los informes o certificados.

Para mantener la trazabilidad de la balanza es recomendable verificar periódicamente que los resultados sean confiables, esto se puede hacer por ejemplo, tomando como referencia un juego de pesas con calibración vigente, de clase y exactitud adecuadas para la balanza que se quiere verificar, teniendo en cuenta las precauciones que implica el manejo de las pesas como es el uso de guantes de algodón y el mantenerlas en un lugar libre de polvo.

El uso de patrones de control tiene el propósito de:

- a) asegurar el mantenimiento de la trazabilidad de las mediciones mediante la comprobación del estado de calibración de los instrumentos y equipos entre las calibraciones programadas;
- b) estimar la contribución de la incertidumbre de la medición atribuible a la deriva de los instrumentos y equipos de medición; y,
- c) determinar con mayor certeza los periodos de recalibración.

Para facilitar la demostración de la trazabilidad, se puede incluir una carta de trazabilidad en donde se muestren las unidades, los patrones, las referencias a las calibraciones, la incertidumbre de medición y la identificación del organismo responsable de cada calibración. Cuando el analito es definido por un método de medición, los patrones de referencia se sustituyen con el nombre del método de medición y la expresión matemática del modelo de la medición.

La figura 1 muestra un ejemplo de carta de trazabilidad de las mediciones realizadas con una medida volumétrica que ha sido calibrada por el método gravimétrico, donde se

muestra la trazabilidad hasta el patrón internacional de masa mantenido en la Oficina Internacional de Pesas y Medidas (BIPM) y al patrón nacional de temperatura termodinámica. (Centro Nacional de Metrología, 2008a)

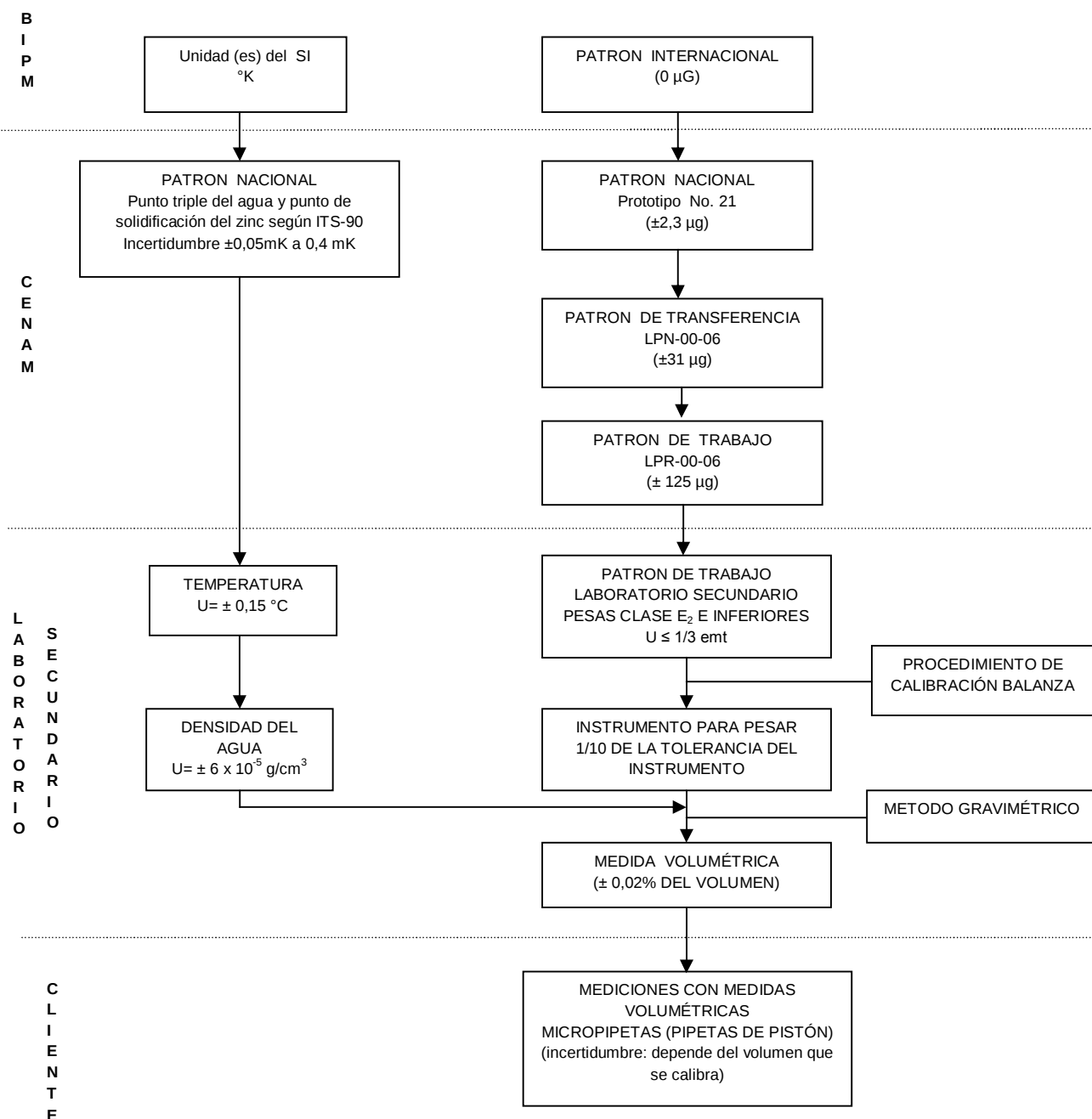


FIGURA 1. Carta de trazabilidad de las mediciones realizadas con una medida volumétrica que ha sido calibrada por el método gravimétrico. (Centro Nacional de Metrología, 2008a)

V.3.3. Espectrofotómetro UV-Visible

La espectrofotometría es una técnica ampliamente utilizada en los laboratorios para el análisis cuantitativo de numerosos compuestos, debido principalmente a su sencillez operativa y a la rapidez en el análisis. La concentración de una sustancia puede ser calculada a partir de la cantidad de luz absorbida por una muestra, en el rango del espectro del ultravioleta (UV) y visible (Vis) aplicando la ley de Lambert-Beer. Por ello, para generar datos confiables es de gran importancia la verificación previa del funcionamiento del espectrofotómetro. Los principales parámetros a controlar en estos equipos son: la exactitud de la longitud de onda, la exactitud y precisión fotométrica, la linealidad fotométrica y la verificación de la luz difusa. (Azcárate. Kloster, Ostinelli, Carreira, 20011)

Soluciones de calibración: Se encuentran disponibles en el mercado materiales de referencia certificados de estas soluciones, aunque las mismas se pueden preparar en el laboratorio a partir de reactivos de alta pureza (99.95%) y cuyas propiedades físicas y químicas sean conocidas.

- ✓ Solución de óxido de holmio en ácido perclórico.
- ✓ Solución de sulfato de cobre en ácido sulfúrico.
- ✓ Solución de ácido sulfúrico 0,005 mol/ L
- ✓ Soluciones de dicromato de potasio: Solución de concentración 0,10 g/L y serie de diluciones de dicromato de potasio (cuatro soluciones de dicromato de potasio a las siguientes concentraciones (g/L) 0,02; 0,04; 0,06 y 0,08 a partir de la solución de 0,10 g/L enrasando a un volumen final de 100 ml con ácido sulfúrico 0,005 mol/L.
- ✓ Solución de nitrito de sodio

Control de la exactitud de la longitud de onda: La desviación de la longitud de onda puede causar errores en los resultados cuantitativos de la lectura en el UV-Vis. En este control se verifica el grado de concordancia entre la longitud de onda seleccionada para la máxima absorbancia y la longitud de onda de referencia.

Con una misma celda o cubeta ajustar el cero (0) del instrumento con la solución de ácido perclórico al 10%. Se recomienda medir según el rango espectral una longitud de onda para el espectro UV y tres longitudes de onda para el espectro Vis. Dependiendo del ancho de banda del equipo, la máxima absorción de la solución de óxido de holmio en ácido perclórico se detectará a las longitudes de onda indicadas en la tabla 1.

Ancho de banda (nm)	λ de máxima absorción (nm)						
Rango UV							
1	241,1	249,9	278,1	287,2	333,5	345,4	361,3
2	241,0	250,1	278,1	287,6	333,5	345,5	361,1
Rango Vis							
1	385,6	416,3	451,4	467,8	485,2	536,6	640,5
2	386,0	416,9	451,3	468,1	485,2	537,2	641,1

Tabla 1. Longitudes de onda (λ) de máxima absorción de la solución de óxido de holmio en ac. perclórico (Azcárate, Kloster, Ostinelli, Carreira, 20011)

Control de la exactitud fotométrica: La exactitud fotométrica se determina comparando la absorbancia de una solución de referencia con la lectura de ésta, obtenida en el espectrofotómetro. Para cubrir satisfactoriamente el rango UV-Vis del espectro, se utilizan dos soluciones diferentes: dicromato de potasio, para el espectro UV y sulfato de cobre, para el espectro Vis.

Con una misma celda ajustar el 0 de absorbancia del instrumento con la solución de ácido sulfúrico de concentración 0,005 mol/L utilizada para preparar las soluciones de referencia.

- Control en el rango UV: Realizar 6 lecturas consecutivas de la solución de dicromato de potasio en ácido sulfúrico de concentración 0,06 g/L a las longitudes de onda d 235, 257, 313 y 350 nm, registrando los valores y confrontándolos con los valores de referencia.
- Control en el rango Vis: Realizar 6 lecturas consecutivas de la solución de sulfato de cobre en ácido sulfúrico a las longitudes de onda de 600, 650, 700 y 750 nm, registrando los valores y confrontándolos con los valores de referencia.

Control de la precisión fotométrica: Se denomina precisión fotométrica a la medida de la dispersión de una serie de mediciones de absorbancia alrededor de la media y se expresa como coeficiente de variación porcentual. Para la determinación, utilizar los datos obtenidos en la prueba de exactitud fotométrica con la solución de dicromato de potasio de 0,06 g/L a las siguientes longitudes de onda: 235, 257, 313, 350 nm.

Control de la linealidad fotométrica: El estudio de la linealidad fotométrica permite establecer el rango de absorbancia en el que el instrumento tiene respuesta proporcional a los cambios de concentración. Para ello se determina la respuesta del espectrofotómetro a diferentes concentraciones de una sustancia que cumpla con la ley de Lambert-Beer.

Se evalúa la linealidad fotométrica realizando lecturas de absorbancia de la serie de soluciones de dicromato de potasio (0,02; 0,04; 0,06; 0,08 y 0,1 g/L), utilizando la solución

de ácido sulfúrico 0,005 mol/L para realizar el ajuste a 0 de absorbancia del equipo. Las longitudes de onda a que se realizan las lecturas serán: 235, 257, 313 y 350 nm.

Control de la luz difusa: Se denomina así a toda radiación electromagnética de longitud de onda distinta a la seleccionada por el monocromador, que alcanza el detector y por lo tanto queda registrada por el instrumento. Este control se basa en la medida del porcentaje de transmitancia de una solución de nitrito de sodio 50 g/L. Esta sustancia tiene la propiedad de que sus soluciones absorben toda la radiación incidente de longitudes de onda menores a los 390 nm, es decir, que es ópticamente opaca a la luz. Por lo tanto, la transmitancia a 340 nm de esta solución debe ser igual a cero y toda la transmitancia detectada corresponde a luz parásita.

El ajuste del equipo a 0 de transmitancia se realiza con aire, luego se mide la transmitancia de la solución de nitrito de sodio a una longitud de onda de 340 nm; se realizan lecturas por triplicado.

La carta de trazabilidad para el espectrofotómetro se muestra en la figura 2.

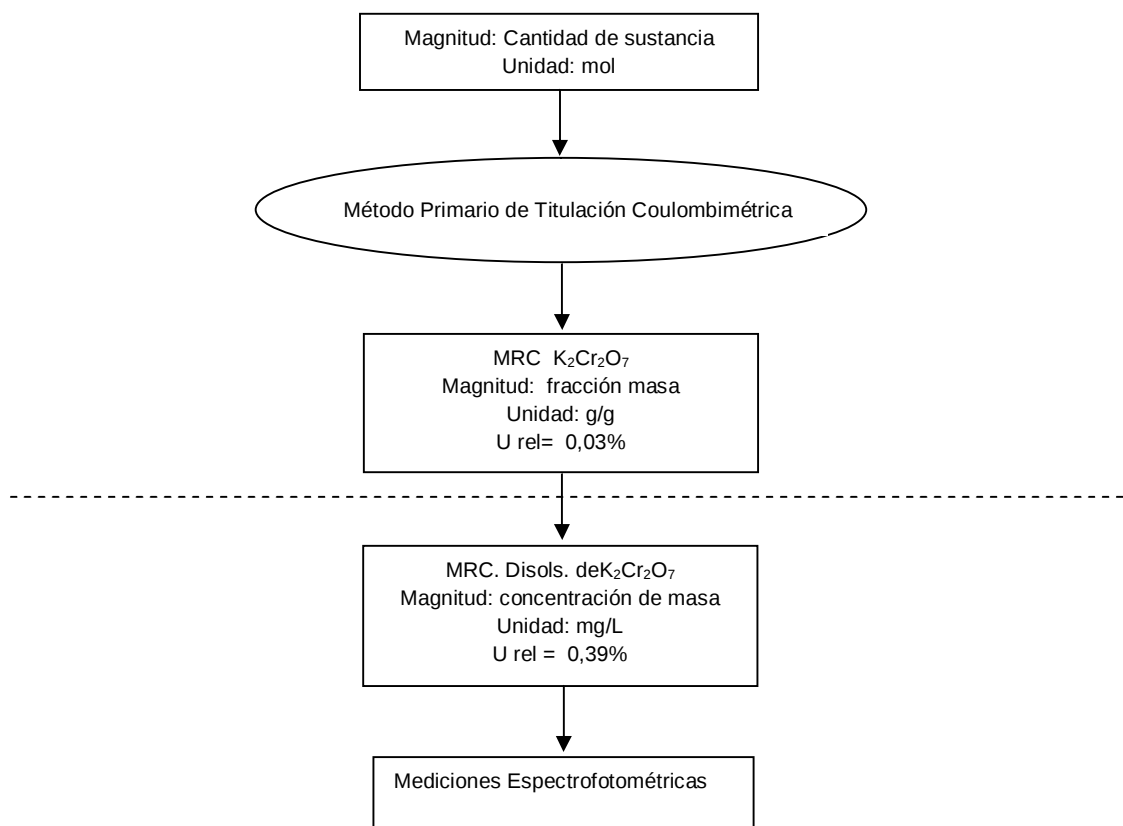


Figura 2. Carta de trazabilidad para la calibración de espectrofotómetros UV-Vis

V.3.4. Termociclador

Desde la invención de la técnica de PCR se han diseñado y manufacturado diferentes tipos y modelos de termocicladores; sobre el paso de las décadas una amplia variedad de técnicas de calentamiento- enfriamiento y mecanismos de control de temperatura se han utilizado. (Thermocycler calibration guide, n.d.)

Con la necesidad de diseñar termocicladores más rápidos, fueron introducidos termocicladores basados en el efecto Peltier; el último desarrollo permite completar una PCR en menos de 30 minutos.

El principio de un elemento Peltier es que ya sea el calentamiento o enfriamiento depende de cómo la corriente eléctrica es aplicada a los elementos. Como resultado estos elementos pueden alternar rápidamente calentamiento y enfriamiento y viceversa. Muchos termocicladores basados en el efecto Peltier están diseñados de acuerdo a la construcción sándwich como se muestra en la Figura 3.

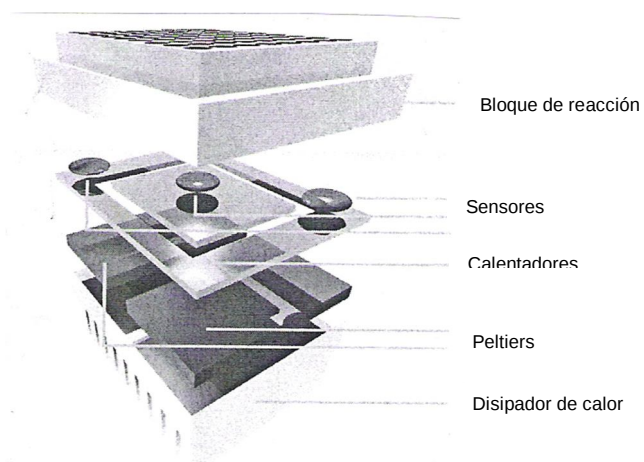


Figura 3: Construcción "Sandwich" de termocicladores basados en Peltier.
(Thermocycler calibration guide, n.d.)

El bloque de reacción que es visible al operador es la cima de la construcción del sándwich. Abajo del bloque están colocados uno o más sensores de temperatura para monitorear la temperatura del bloque de reacción y proporciona la entrada al mecanismo de control que regula el calor generado por el calentador (o filamento) y el elemento Peltier. Durante la fase de calentamiento el calor es transferido al bloque de reacción y luego a los tubos de reacción y a los reactivos dentro de ellos. Durante la fase de enfriamiento el elemento Peltier se enfría en un lado y transfiere este frío al bloque de reacción, del otro lado el elemento Peltier genera calor, es cual es transferido al disipador de calor y después enviado al ambiente a través del ventilador.

El funcionamiento térmico de un termociclador depende de un número de variables; las principales son: la construcción del bloque “sándwich”, los diferentes tipos y calidad de los componentes usados, las diferencias en el diseño técnico, el número de sensores y el mecanismo de control de temperatura.

La variabilidad inter termociclador es la razón por la cual la técnica de PCR arroja resultados diferentes en diferentes termocicladores.

La variabilidad intratermociclador (misma marca pero diferentes modelos) es la razón por la cual ciertos pozos generan resultados falsos negativos mientras que otros generan resultados positivos durante la misma corrida en el mismo termociclador.

Calibración del termociclador conforme a estándares internacionales

Desde una perspectiva metrológica la mejor manera de calibrar un termociclador es a través de una medición de manera definida y trazable, por personal calificado, bajo condiciones ambientales definidas, con la más baja y conocida incertidumbre de medida, excluyendo tantas variables no controladas como sea posible.

Para que una calibración sea certera, cumpla con la norma ISO 17025 y sea representativa de la técnica de PCR deben considerarse los siguientes criterios: La calibración debe ser realizada sobre todas las características térmicas que influyen el resultado de PCR, incluyendo exactitud, uniformidad, velocidad de calentamiento/enfriamiento y tiempo de retención; realizada de una manera dinámica (ya que PCR es un proceso dinámico y no estático) simultáneamente con multicanales para excluir algún efecto del tiempo entre pozos, bajo condiciones ambientales controladas, por personal calificado y entrenado y trazable a ITS-90 (Escala Internacional de Temperatura Absoluta) y expresando los valores de calibración en unidades del SI con una incertidumbre calculada.

Para cubrir estos criterios un sistema típico de calibración de un termociclador sería: un sensor físico basado en un sistema multicanal que mida dinámicamente con una frecuencia de más de una vez por segundo y que pueda ser calibrado trazable a ITS-90 a través de un estándar de referencia de temperatura.

Calibrando con equipo calibrado trazablemente, bajo condiciones ambientales controladas, con personal calificado, directamente en el bloque en un número de pozos relevante estadísticamente, es posible obtener una incertidumbre total de la medición tan baja como 0.1°C para un sistema multicanal. Esto permite tener un estado de certeza sobre el valor medido y permite la comparación a especificaciones definidas ya sea por laboratorios o fabricantes.

La figura 4 muestra la carta de trazabilidad para la calibración del termociclador.

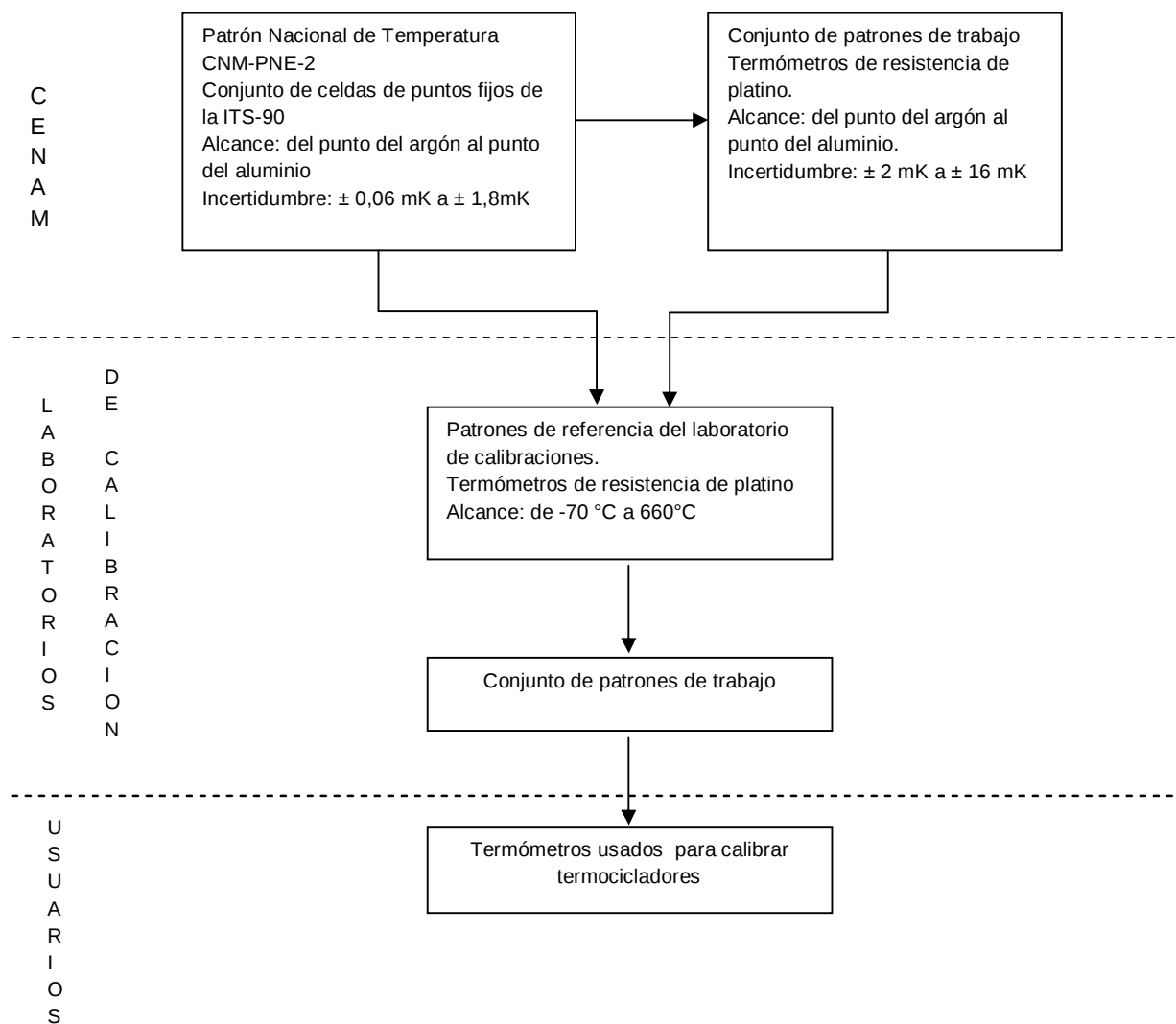


Figura 4. Carta de trazabilidad para la calibración de termocicladores

RESULTADOS

PLAN INTEGRAL DE IMPLEMENTACIÓN DE UN ESQUEMA PARA DAR CUMPLIMIENTO A LOS REQUISITOS TÉCNICOS DE LA NORMA NMX-EC-17025-IMNC-2006 CON LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS

REQUISITO TÉCNICO DE LA NORMA NMX-EC-17025-IMNC-2006	PROPUESTA DE CUMPLIMIENTO
5.1 Generalidades	Describir el principio del método, las etapas de las que consta el análisis, el método de preparación de la muestra, el material de prueba y los requisitos generales de laboratorio.
5.2 Personal	Establecer la competencia del personal que estará a cargo de las actividades del ensayo: El personal debe estar calificado y tener experiencia para trabajar con la técnica de PCR; además, tener conocimientos básicos sobre microbiología general, validación de métodos de ensayo, matemáticas, inglés y buenas prácticas de laboratorio.
5.3 Instalaciones y condiciones ambientales	Definir el número de áreas de trabajo adecuadas y las actividades a realizar en cada área: Contar con un mínimo de 4 áreas de trabajo separadas, con sus propios instrumentos y equipos de medición para realizar las actividades de: Preparación de la solución de ácido nucleico, preparación de la mezcla de reacción, adición de la solución del ácido nucleico, detección y confirmación de los productos de PCR.
5.4 Método de ensayo y validación del método	Describir las etapas del método de ensayo: - Enriquecimiento y tratamiento de la muestra para bacterias de acuerdo al estándar ISO apropiado. - Extracción y purificación del ADN: liberar el ADN por ruptura celular térmica (ebullición), centrifugar y utilizar el sobrenadante para la reacción de PCR. Determinar la concentración y pureza del ADN aislado por métodos fluorométricos o por electroforesis en gel de agarosa. Cuantificar el ADN purificado por métodos espectrofotométricos seguido de tinción con bromuro de etidio y fluorescencia bajo luz ultravioleta. - Amplificación por PCR: Desnaturalización del ADN por calentamiento; alineación de los cebadores (iniciadores) oligonucleótidos a la secuencia objetivo complementaria; extensión de los cebadores con desoxirribonucleótidos trifosfatos por una ADN polimerasa a temperatura adecuada. - Detección y/o confirmación de los productos de PCR

REQUISITO TÉCNICO DE LA NORMA NMX-EC-17025-IMNC-2006	PROPUESTA DE CUMPLIMIENTO
	por electroforesis en gel de agarosa. Estimar el tamaño de los productos de PCR por comparación con estándares de ADN de longitud conocida. Describir la metodología para validar el método de ensayo: - Realizar un estudio de comparación del método de PCR con el método de referencia actual, utilizando muestras inoculadas con un nivel conocido del microorganismo objetivo y muestras contaminadas naturalmente. Determinar la exactitud analítica que incluye la validación primaria sobre cultivos celulares purificados para el establecimiento del límite de detección (en función de la probabilidad de detección) y la selectividad. Determinar la exactitud diagnóstica tomando en cuenta a los microorganismos objetivo y no objetivo en presencia de una matriz biológica, comprende los términos especificidad y sensibilidad. - Realizar un estudio interlaboratorios utilizando el par de cebadores (iniciadores) más selectivo, para validar la reproducibilidad de la exactitud analítica del método de PCR; determinando para cada laboratorio participante los siguientes parámetros de desempeño: Inclusividad, exclusividad, predictividad positiva, predictividad negativa, exactitud analítica e índice Kappa. Estimar la incertidumbre de la medición - Identificar las fuentes de incertidumbre para el método de ensayo de PCR (elaborar un diagrama de causa y efecto). - Evaluar la contribución a la incertidumbre de la medición de aquellas fuentes relacionadas con valores numéricos (instrumentos y equipos de medición), siguiendo la metodología propuesta por el documento JCGM 100:200. Evaluar la incertidumbre en la toma de decisión del resultado presencia/ausencia a través de un estudio de precisión intermedia estimando los parámetros "Acordancia" y "Concordancia".
5.5 Equipos y reactivos	Determinar las características y especificaciones de los materiales, instrumentos y equipos de medición. Establecer la frecuencia de los mantenimientos y calibraciones del equipo crítico.

REQUISITO TÉCNICO DE LA NORMA NMX-EC-17025-IMNC-2006	PROPUESTA DE CUMPLIMIENTO
	Además del equipo, instrumentos y material estándar de laboratorio se debe utilizar: Termociclador con rango de temperatura 0-100°C, precisión de la temperatura $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$, uniformidad $\pm 0.4^{\circ}\text{C}$; Pipetas de pistón (micropipetas) con alcance a 5, 50 y 100 μl y con incertidumbre expandida ($k=2$) de $\pm 0,8\%$, $\pm 0,3\%$ y $\pm 0,3\%$ del volumen respectivamente, espectrofotómetro UV-Vis con exactitud de longitud de onda aceptable (UV $\pm 1\text{ nm}$, Vis $\pm 3\text{ nm}$), exactitud fotométrica (error entre $\pm 2\%$ óptima, entre $\pm 3\%$ aceptable), precisión fotométrica (coeficiente de variación $< 0,5\%$ óptima, $< 1\%$ aceptable), linealidad fotométrica (coeficiente de regresión $\geq 0,999$ aceptable); sistema para la detección de productos de PCR como aparatos para electroforesis en gel de agarosa y una fuente de radiación UV; tubos (contenedores) de reacción para biología molecular y termo resistentes. Utilizar equipo con mantenimiento apropiado de acuerdo a las instrucciones del fabricante y a la frecuencia de uso. Realizar la calibración rutinaria del equipo cuyo funcionamiento impacta en el resultado del ensayo. Utilizar reactivos analíticamente puros grado biología molecular, particularmente para los siguientes reactivos: ADN polimerasa, transcriptasa reversa, buffer de reacción, desoxidorribonucleótidos trifosfatos para PCR, cebadores (iniciadores), agua, cloruro de magnesio y químicos para la detección de productos de PCR.
5.6 Trazabilidad de las mediciones	Demostrar la trazabilidad para el método de PCR a través del empleo de cepas de referencia en el proceso de validación (establecer la metodología para la utilización general de cepas de referencia) y de la trazabilidad en la calibración de los instrumentos y equipos de medición críticos (haciendo uso de cartas de trazabilidad), obteniendo de esta manera la trazabilidad del conjunto equipo- método de ensayo.
5.7 Muestreo	Definir si el laboratorio de ensayo es responsable de realizar el muestreo inicial para obtener los especímenes del ensayo. Seleccionar el alimento en base a la frecuencia de la

REQUISITO TÉCNICO DE LA NORMA NMX-EC-17025-IMNC-2006	PROPUESTA DE CUMPLIMIENTO
	presencia del microorganismo objetivo en el alimento, eligiendo la categoría conveniente. Seleccionar el documento ISO que sirva de guía para realizar el muestreo dependiendo de la naturaleza del alimento por ejemplo ISO/FDIS 17604 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Muestreo de cadáveres para análisis microbiológico.
5.8 Manipulación de los ítems (elementos) de ensayo	Iniciar el tratamiento de la muestra directamente de la muestra o después del enriquecimiento. Las muestras de prueba pre-enriquecidas deben repartirse en alícuotas de 1 ml y almacenarlas a -30°C hasta su uso por cada laboratorio (en el caso de la validación). Cada laboratorio debe tener el procedimiento de operación estándar para realizar la detección del patógeno por el método de PCR. Si las muestras son de diferentes alimentos deben analizarse separadamente en cada laboratorio con el fin de evitar contaminación cruzada. Las muestras pre-enriquecidas congeladas deben descongelarse y realizar la extracción (por lisis celular), la preparación del ácido nucleico y/o purificación de la muestra de prueba de acuerdo al método que se describió en el capítulo de validación.
5.9 Aseguramiento de la calidad de los resultados del ensayo	Establecer los controles requeridos para el análisis de muestras basado en PCR para llevar a cabo el control de calidad interno. Determinar las características de funcionamiento del método de PCR a través de una prueba interlaboratorio o intralaboratorio para llevar a cabo el control de calidad externo (ensayos de aptitud). El aseguramiento de la calidad debe incluir la validación del método, calibrar y confirmar los instrumentos de medición, calificar y confirmar el equipo de medición y entregar el resultado con la incertidumbre estimada.
5.10 Informe de los resultados	El informe de la prueba debe contener al menos la información que se presenta en el apartado II.1.10. de esta tesis.

CONCLUSIONES

En esta tesis se abordó la problemática metrológica que involucra el cumplimiento de los requisitos técnicos de la norma ISO/IEC 17025:2005 con la técnica de PCR para la detección de patógenos transmitidos por alimentos a pesar del documento de aplicación existente.

Se analizó y desarrolló cada uno de los requisitos técnicos de la norma y se propuso el camino para cumplir con aquellos que presentan limitantes por la propia naturaleza del ensayo como fueron la validación, la estimación de la incertidumbre de medida y la determinación de la trazabilidad que se abordaron en capítulos independientes debido a su amplitud.

En cuanto a la validación, la principal limitación que se encuentra en este tipo de técnicas es el disponer de muestras positivas; en este aspecto pueden utilizarse muestras contaminadas naturalmente o bien productos inoculados con un nivel conocido de microorganismos contaminantes. Es importante señalar que la inoculación de una matriz con microorganismos imita tan solo de una manera superficial la presencia de contaminantes naturales, debe considerarse que los microorganismos están en continuo proceso de crecimiento, es decir la cantidad de microorganismos presentes en la matriz va a cambiar con el tiempo; por lo tanto, dicho factor repercute seriamente sobre la intercomparación de resultados dado que alícuotas de una misma muestra deben analizarse simultáneamente. En estos estudios será importante realizar paralela y simultáneamente muestras no inoculadas a fin de determinar posibles contaminaciones ambientales.

Aun cuando los análisis microbiológicos se encuadran en la categoría de los ensayos que no permiten realizar un cálculo riguroso metrológica y estadísticamente válido de la incertidumbre de medida, debido a los sesgos biológicos, instrumentales y del personal, se propuso estimarla a través de un estudio de precisión intermedia en términos de acordancia y concordancia (para datos cualitativos) equivalentes a repetibilidad y reproducibilidad (para datos cuantitativos) que representan las piedras angulares de la estimación de la incertidumbre analítica; además, también se propuso evaluar la contribución a la incertidumbre de la medición de aquellas fuentes relacionadas con valores numéricos siguiendo la metodología propuesta por JCGM 100: 2008; de esta manera, se consideran la incertidumbre en el momento de la medición y la incertidumbre en la toma de decisión.

Siendo la trazabilidad una de las principales herramientas requeridas para la comparación, se propuso demostrarla para la técnica de PCR a través de las cepas de referencia utilizadas en el procedimiento de validación y de la trazabilidad en la calibración/verificación de los equipos críticos al interior del procedimiento; logrando entonces, la trazabilidad del conjunto equipo- método de ensayo. Las cepas de referencia deben obtenerse directamente de una colección nacional o internacional reconocida dado

que solo en este caso puede asegurarse la trazabilidad de los microorganismos. Debe considerarse que los microorganismos pueden sufrir con relativa facilidad problemas o mutaciones y/o transformaciones. Además de la trazabilidad de los microorganismos, debe asegurarse también la trazabilidad de los resultados, para ello disponer de estándares de concentración conocida resulta imprescindible. No puede asegurarse con exactitud la concentración de microorganismos en los estándares microbiológicos. Aun cuando sea posible adquirir comercialmente cepas liofilizadas, el proceso de rehidratación no puede asegurarse en todos los casos con un 100% de eficacia. Además las empresas suministradoras tampoco pueden garantizar el contenido exacto de microorganismos puesto que algunos de ellos pueden haber sufrido procesos de lisis no controlados durante el proceso de liofilización. Como consecuencia, el uso de un método de recuento resulta esencial para establecer la concentración de dichos estándares. Cualquier nuevo método desarrollado debe ser trazable al método clásico de recuento.

De manera que la hipótesis planteada en un principio resultó ser verdadera al generar un plan integral de implementación de un esquema para cumplir con los requisitos técnicos de la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 (ISO/IEC 17025:2005) y que los laboratorios que realizan ensayos microbiológicos con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa puedan asegurar la calidad de los resultados obtenidos.

A pesar del potencial del diagnóstico de PCR, para poder extender su aplicación será necesario atender aspectos como: una preparación más eficiente de la muestra, desarrollo de facilitadores de PCR, distinción de células viables de las muertas, PCR cuantitativo (en muestras de alimentos no enriquecidos), disponer de material de referencia de ADN y la automatización.

BIBLIOGRAFÍA

1. AOAC International, (2006). Final Report and Executive summaries from the AOAC International Presidential Task force on Best Practices in Microbiological Methodology. Appendix J-STWG Part 3-Uncertainty.
2. Azcárate, M., Kloster, N., Ostinelli, M., Carreira, D. (2011). Guía para la verificación de espectrofotómetros UV-Visible utilizados en el análisis de suelo y agua. VI Congreso Virtual Iberoamericano Gestión de Calidad en Laboratorios. 1° de febrero al 15 de septiembre de 2011. [En línea]. Disponible en: www.iberolab.org [Accesado en enero de 2012].
3. Centro Nacional de Metrología, (2008 a). Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en los servicios de calibración de recipientes volumétricos por el método gravimétrico. México, Centro Nacional de Metrología (CENAM).
4. Centro Nacional de Metrología, (2008 b). Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean la técnica de espectrofotometría de ultravioleta- visible. México, Centro Nacional de Metrología (CENAM).
5. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México, A.C. (2002). Guía de validación de métodos analíticos.
6. Comisión Interinstitucional de Buenas Prácticas de Fabricación, cipam. (2004). Guía de verificación de instrumentos analíticos. Monografía Técnica No. 23. Primera edición. México, D.F.
7. Comisión Interinstitucional de Buenas Prácticas de Fabricación, cipam. (2006). Buenas Prácticas de Validación. Monografía Técnica No. 24. Primera edición. México, D.F.
8. Eurachem, The Fitness for Purpose of Analytical Methods (1998). A laboratory guide to method validation and related topics.
9. Eurachem/EA Guide 04/10 (2002). Accreditation for Microbiological Laboratories.
10. González, T., Rojas, R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*, septiembre- octubre 2005, 47(5).
11. Gras, N. (n.d.). Control y garantía de calidad en laboratorios analíticos. *Sustentabilidad y Medio Ambiente*. Chile, consultada en octubre de 2012, <http://web.usach.cl/ima/ngras.htm>

12. ISO 10012:2003. Measurement management systems- Requirements for measurement process and measuring equipment. International Organization for Standardization.
13. ISO 16140:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Protocol for the validation of alternative methods. International Organization for Standardization.
14. ISO 20837:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens- Requirements for sample preparation for qualitative detection. International Organization for Standardization.
15. ISO 20838:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens- Requirements for amplification and detection for qualitative methods. International Organization for Standardization.
16. ISO 21748:2010. Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation. International Organization for Standardization.
17. ISO 3534-2:2006. Statistics- Vocabulary and Symbols- Part 2: Applied statistics. International Organization for Standardization.
18. ISO 5725-1:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Part 1: General principles and definitions. International Organization for Standardization.
19. ISO 5725-2:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. International Organization for Standardization.
20. ISO 5725-3:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. International Organization for Standardization.
21. ISO/FDIS 22174:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens- General requirements and definitions. International Organization for Standardization.
22. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organization for Standardization.

23. ISO/TS 11133-1:2009. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Guideliness on preparation and production of culture media- Part 1: General guideliness on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory. International Organization for Standardization.
24. ISO/TS 20836:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens- Performance testing for thermal cyclers. International Organization for Standardization.
25. JCGM 100:2008. Evaluación de datos de medición. Guía para la expresión de la incertidumbre de medida. Centro Español de Metrología.
26. Langton, S., Chevennement, R., Nalgekerke, N., Lombard, B. (2002). Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. *International Journal of Food Microbiology*, 79; 175-181.
27. Love, J., Scholes, P., Gilpin, B., Savill, M., Lin, S., Samuel, L. (2006). Evaluation of uncertainty in quantitative real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, [En línea] 2006, disponible en: www.sciencedirect.com [Accesado el 10 de noviembre de 2012].
28. Malorny, B., Tassios, T., Radström, P., Cook, N., Wagner, M., Hoofar, J. (2003 a). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 83; 39-48.
29. Malorny, B., Hoofar, J., Bunge, C., Helmuth, R. (2003 b). Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an International Standard. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1); 290-296.
30. Malorny, B. et al., (2004). Multicenter validation of PCR. Based method for detection of Salmonella in chicken and pig samples. *Journal of AOAC International*, 87(4); 861-866.
31. NMX-EC 17025-IMNC-2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, A.C.
32. Olvera, M., Valencia, A. (2012). Repetibilidad y reproducibilidad de métodos generales de análisis de tipo cualitativo. Caso especial: Aspecto de la solución. Simposio de Metrología, 8 al 12 de octubre de 2012, Querétaro, Qro. México.
33. Pérez, J., Pujol, M. (2001). Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria.

34. Perruchet, Ch., Priel, M. (2001). Estimación de la incertidumbre. Medidas y ensayos. Madrid: AENOR.
35. Rodríguez, I., Barrera, H. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, julio- septiembre 2004, VII (3), 323-335.
36. Rodríguez, R., Aguilar, C., Ayala, L., Rocha, J., Padilla, V., Espinosa, T. (2009). "Detección de microorganismos mediante métodos moleculares" en AQM Revista de Divulgación Científica [En línea] No.1. 2009, Universidad Autónoma de Coahuila, disponible en:
<http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/AQM.html> [Accesado el 18 de octubre de 2012].
37. Simonet, M. (2005). Aproximación metrológica al análisis microbiológico de alimentos. Ponencia No. 088. 3^{er} Congreso Español de Metrología, 11, 12 y 13 de mayo de 2005, Zaragoza, España.
38. Thermocycler Calibration Guide. (n.d.) Consultado en enero de 2012 en www.cyclertest.com
39. Torres, N. (2011). Nutrición Molecular. Manual de laboratorio. Escuela de Dietética y Nutrición del ISSSTE. Práctica No. 5.
40. Uruburu, F. (1999). La Sociedad Española de Metrología y el aseguramiento de la calidad microbiológica. *Actualidad SEM*, 28, 12-13.
41. Vander Voet, H., van Raamsdonk, L. (2004). Estimation of accordance and concordance in inter-laboratory trials of analytical methods with qualitative results. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 231-234.
42. Wilrich, P. (2010). The determination of precision of qualitative measurement methods by interlaboratory experiments. *Accreditation and Quality Assurance*, 15: 439-444.

ANEXO A

Estándares concernientes al enriquecimiento de microorganismos (bacterias)

Los estándares ISO listados en la siguiente tabla contienen información concerniente al enriquecimiento de microorganismos (bacterias).

Bacteria	Estándar
<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579
<i>Staphylococcus aureus</i>	ISO 6888-3
<i>Bacillus cereus</i>	ISO 7932
<i>Clostridium perfringens</i>	ISO 7937
<i>Thermotolerant campylobacter</i>	ISO 10272
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ISO 10273
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-1
<i>Escherichia coli</i> O157	ISO 16654
<i>Shigella</i> spp.	ISO 21567