

INDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN.....	2
3. SELECCIÓN, VERIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO	3
3.1. Métodos Normalizados y basados en métodos normalizados (Anexo I del CGA-ENAC-LEC)	3
3.2. Métodos desarrollados por el laboratorio (Anexo I del CGA-ENAC-LEC)	5
4. ESTIMACIÓN DE INCERTIDUMBRE	5
5. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE ENSAYO	6
5.1. Control interno	6
5.2. Control externo (intercomparaciones).....	6
6. REFERENCIAS.....	7

ANEXO I: CEPAS DE REFERENCIA

MODIFICACIONES RESPECTO A LA VERSIÓN ANTERIOR

Se actualiza y ajusta el apdo. 1 Introducción, y se concreta los documentos de referencia,

Se ajusta el texto del apdo.2 y se incorpora la posibilidad de incluir nuevos anexos al documento.

Nuevo título del Apdo. 3 en línea con la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017

En apdo.3 se incorporan los nuevos criterios de verificación y validación de métodos en Microbiología de la cadena alimentaria, provenientes de las normas UNE-EN ISO 16140 -3 y UNE-EN ISO 16140-4 (Apdos. 3.1.2 y 3.2)

NOTA IMPORTANTE

El documento es de aplicación desde la fecha de entrada en vigor para nuevos ensayos no acreditados incluidos, a partir de esa fecha, en solicitudes Iniciales y de Ampliación, así como en solicitudes de Ampliación a nuevos productos en ensayos acreditados y en modificaciones de éstos para las que se establezca que requieren de una nueva verificación del funcionamiento o validación. Las verificaciones y validaciones de ensayos acreditados en el momento de la entrada en vigor del documento, no será necesario que se revisen de acuerdo a los nuevos criterios establecidos en el apdo. 3 Selección, verificación y validación de métodos microbiológicos. No obstante, si se producen cambios en los métodos de referencia o alternativos que afecten a ensayos acreditados y si se identifican incumplimientos en las auditorías de mantenimiento, siempre que se establezca que requieren de una nueva verificación del funcionamiento o de una nueva validación serán de aplicación los criterios establecidos en este documento.

La norma UNE-EN ISO 16140-3 no es obligatoria para demostrar el cumplimiento del requisito 7.2.1 de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 siempre que se apliquen procedimientos que proporcionen resultados equivalentes en la verificación de los métodos microbiológicos para el análisis de muestras de la cadena alimentaria.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo y realización de análisis de control microbiológico es una herramienta que tiene una repercusión decisiva en los ámbitos Agroalimentario, de la Salud Pública, la tecnología alimentaria o el Medio Ambiente.

Los criterios de acreditación de ENAC deben mantenerse siempre en línea con las tendencias que las comunidades científica y tecnológica establecen como más apropiadas en documentos de referencia, que en el caso del Análisis Microbiológico son los documentos ISO (normas de ensayo, serie de normas ISO 16140, ISO/TR 13843, ISO 17994) así como la propia reglamentación que, a su vez, remite a esos documentos.

Para una correcta utilización de este documento debe consultarse el Anexo I del documento CGA-ENAC-LEC “Criterios Generales de Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración” que tiene por objeto documentar los criterios de evaluación que ENAC viene utilizando a la hora de determinar que el laboratorio ha realizado una correcta selección de los métodos para los que solicita la acreditación y ha demostrado de manera adecuada su validez.

Así los métodos alternativos, que son aquellos métodos que han sido validados por comparación con el método de referencia que corresponda, de acuerdo a un estándar aceptado (ej. ISO 16140, ISO/TR 13843, ISO 17994 etc.) y que son generalmente reconocidos por la comunidad científica y tecnológica como equivalentes al método de referencia, se consideran como **métodos normalizados** de acuerdo a la definición establecida en el apartado A.2 del Anexo I del CGA-ENAC-LEC.

2. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

El objetivo de este documento es establecer con mayor precisión los criterios a utilizar por ENAC para la acreditación de los laboratorios que realizan ensayos microbiológicos, facilitando así su implantación en los laboratorios y su evaluación por parte de ENAC.

Se ha previsto la posibilidad de incorporar anexos a este documento, relativos a cuestiones técnicas de interés, elaborados en su caso, en colaboración con organizaciones técnicas competentes. Así, se incluye un anexo sobre manipulación y conservación de cepas referencia, elaborado en colaboración con la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

En la elaboración de este documento han participado la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) y la Asociación de Entidades de Ensayo, Calibración y Análisis-FELAB – (EUROLAB-España-Asociación Española de Laboratorios de Ensayo, Calibración y Análisis / AELI – Asociación Española de Laboratorios Independientes).

3. SELECCIÓN, VERIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO

3.1. Métodos Normalizados¹ y basados en métodos normalizados (Anexo I del CGA-ENAC-LEC)

3.1.1 Criterios generales

De manera general, las características de funcionamiento que al menos se deben confirmar en estos casos teniendo en cuenta la naturaleza del método son:

- Métodos cuantitativos:

- **Recuperación**

Debería evaluarse a partir de valores de referencia. Estos valores podrían obtenerse por comparación con métodos de referencia, a partir de muestras inoculadas con materiales de referencia o cepas de referencia o a partir de resultados de interlaboratorios.

- **Reproducibilidad**

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

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

- Métodos cualitativos:

- **Límite de detección**

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

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

- *Actividades de control de calidad interno:* Los resultados obtenidos en las actividades de control de calidad interno aplicando el método de ensayo a confirmar, pueden ser utilizados en la comprobación del método (ej. nuevas matrices).

1 Los métodos alternativos, que son aquellos métodos que han sido validados por comparación con un método de referencia (norma de ensayo ISO) de acuerdo a un estándar aceptado (ISO 16140-2, ISO 17994) y que son generalmente reconocidos por la comunidad científica y tecnológica como equivalentes al método de referencia, se consideran como Métodos normalizados.

- *Participación en Intercomparaciones (Control de calidad externo)*: Los resultados obtenidos en la participación en intercomparaciones, también pueden ser utilizados. Para ello, el laboratorio deberá evaluar la idoneidad y calidad del programa de intercomparación, valorando si es adecuado utilizar la información proporcionada por el ejercicio en la comprobación.

3.1.2 Microbiología de la cadena alimentaria²

En este apartado se establecen los criterios de acreditación relacionados con la verificación de determinados métodos microbiológicos, tanto de detección como de cuantificación, en la cadena alimentaria aplicando la norma UNE-EN ISO 16140-3.

Cuando el método de ensayo seleccionado por el laboratorio sea un método de referencia validado (método incluido en las normas UNE, ISO o CEN) o un método alternativo o un método interno claramente basado en uno de los dos tipos anteriores, será necesario que el laboratorio lleve a cabo una verificación de acuerdo con el protocolo descrito en la norma UNE-EN ISO 16140-3 incluyendo tanto la etapa de *verificación de la implementación* como la de *verificación de matrices*.

Respecto a la selección de matrices en la segunda etapa, cuando se utilizan métodos incluidos en las normas UNE, CEN o ISO para el análisis de muestras de una Categoría de productos que, estando dentro de la cadena alimentaria, no se contempla dentro de las Categorías definidas en el Anexo A de la norma UNE-EN ISO 16140-2 (por ejemplo, Complementos alimenticios, Novel Foods, Aditivos alimentarios, Aditivos para piensos) el laboratorio deberá incorporar matrices “difíciles” de esa Categoría de productos, estableciendo si es necesario diferentes Tipos (de muestras) dentro de la Categoría (por ejemplo, por un origen o característica común).

El laboratorio, en función de la naturaleza del método seleccionado, determinará sus Características de rendimiento de acuerdo con la Tabla 2 del apdo. 4.5 de la norma UNE-EN ISO 16140-3:

- Métodos cualitativos: se determinará el Límite de detección estimado ($eLOD_{50}$) tanto en la verificación de implementación como en la verificación de matrices.
- Métodos cuantitativos: se determinará la Desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR}) solo en la etapa de verificación de la implementación y la Desviación estimada ($eBias$) en la etapa de verificación de matrices.

Para ello, se seguirán los protocolos técnicos descritos en los apdos. 5 (Métodos cualitativos) y 6 (Métodos cuantitativos) de la norma UNE-EN ISO 16140-3 y se aplicarán los Límites de aceptabilidad establecidos (ver resumen en apdo. 8 de UNE-EN ISO 16140-3) para evaluar los resultados obtenidos.

² Se consideran dentro de la cadena alimentaria tanto los productos pertenecientes a las diferentes Categorías establecidas en el Anexo A de la norma UNE-EN ISO 16140-2 (Alimentos, Piensos, Muestras ambientales, Muestras producción primaria) como otros grupos de productos como pueden ser los Complementos Alimenticios, Novel Food, Aditivos alimentarios o Aditivos para piensos.

Si el método seleccionado por el laboratorio es un método de referencia no validado se podrá realizar su verificación de acuerdo al Anexo F de la norma UNE-EN ISO 16140-3 hasta el 31/12/2027, realizándose únicamente la etapa de verificación de matrices, de acuerdo con las reglas técnicas descritas en el citado Anexo.

3.2. Métodos desarrollados por el laboratorio (Anexo I del CGA-ENAC-LEC)³

La norma UNE-EN ISO/IEC 17025 en su apartado 7.2.2.1 establece que el laboratorio debe validar los métodos no normalizados y los métodos que diseña o desarrolla para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. Por tanto, para este tipo de métodos, el laboratorio deberá evaluar su idoneidad para su ámbito de aplicación así como las actividades necesarias a realizar para garantizar su validez técnica.

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

ENAC deberá disponer de evidencias completas de que dichos métodos han sido adecuadamente validados.

Cuando se trate de métodos no validados seleccionados para su aplicación en productos de la cadena alimentaria, se considerará que han sido adecuadamente validados si la validación se ha llevado a cabo de acuerdo con alguno de los protocolos técnicos de la norma ISO 16140-4.

La validación de acuerdo con la norma ISO 16140-4 solo será aceptable en el laboratorio que la ha llevado a cabo, no siendo posible su generalización a otros laboratorios dado que no se han llevado a cabo estudios interlaboratorio y será necesaria cuando el método seleccionado por el laboratorio no esté validado, cuando el laboratorio desee extender el alcance de un método alternativo a productos que no estén incluidos en el alcance de la validación o cuando se realicen determinadas modificaciones de métodos existentes. También será necesaria a partir del 01/01/2028 para métodos de referencia no validados.

4. ESTIMACIÓN DE INCERTIDUMBRE

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

En el caso de ensayos microbiológicos cuantitativos en productos de la cadena alimentaria el documento ISO/TS 19036 puede utilizarse como referencia.

En el caso de análisis microbiológico de aguas existe el documento ISO 29201.

³ De acuerdo con el documento NT-86 este tipo de métodos se identifica en el alcance de acreditación como "Método interno" e identificando la revisión en vigor.

5. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE ENSAYO

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

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

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

5.1. Control interno

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

Ensayos cuantitativos:

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

Ensayos cualitativos:

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

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

5.2. Control externo (intercomparaciones)

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

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

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

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

6. REFERENCIAS

- UNE-EN ISO/IEC 17025 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”
- CGA-ENAC-LEC “Criterios Generales para la acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración según Norma UNE-EN ISO/IEC 17025”
- NT-86 “Laboratorios de ensayo y calibración: identificación de los métodos en los alcances de acreditación y acciones a tomar en caso de ser revisados”
- Reglamento (CE) nº 2073/2005, de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- UNE-EN ISO 7218 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico”
- UNE-EN ISO 16140-1: “Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 1: Vocabulario”
- UNE-EN ISO 16140-2 “Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia”
- UNE-EN ISO 16140-3 “Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 3: Protocolo para la verificación en un único laboratorio de métodos de referencia y de métodos alternativos validados”
- UNE-EN ISO 16140-4 “Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 4: Protocolo para la validación de métodos internos de un laboratorio”
- ISO/TR 13843 “Water quality – Guidance on validation of microbiological methods”.

- UNE-EN ISO 17994 “Calidad del agua. Requisitos para la comparación de la tasa de recuperación relativa de microorganismos por dos métodos cuantitativos”
- UNE-EN ISO 8199 “Calidad del agua. Requisitos y orientaciones generales para el recuento de microorganismos mediante cultivo”
- ISO/TS 19036 “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations”.
- UNE-EN ISO 6887-1 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y diluciones decimales”.
- UNE-EN ISO 6887-2 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 2: Reglas específicas para la preparación de carne y productos cárnicos”.
- UNE-EN ISO 6887-3 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 3: Reglas específicas para la preparación de pescados y productos de la pesca”.
- UNE-EN ISO 6887-4 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 4: Reglas específicas para la preparación de productos distintos a leche y productos lácteos, carne y productos cárnicos y, pescados y productos de la pesca”.
- UNE-EN ISO 6887-5 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 5: Reglas específicas para la preparación de leche y productos lácteos”.
- UNE-EN ISO 6887-6 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 6: Reglas específicas para la preparación de muestras tomadas en la etapa de la producción primaria”.
- UNE-EN ISO 11133. “Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua. Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo”
- ISO 29201. “Water Quality – The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods”

La edición en vigor de este documento está disponible en www.enac.es. Las organizaciones acreditadas deben asegurarse de que disponen de la edición actualizada.

Puede enviar a ENAC sus puntos de vista y comentarios en relación con este documento, así como sus propuestas de cambio o de mejora para futuras ediciones, en la siguiente dirección (calidad@enac.es) indicando en el asunto el código del documento.

CEPAS DE REFERENCIA

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

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

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

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

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