



Validación de los métodos microbiológicos

**CARACTERÍSTICAS DE LOS RESULTADOS  
DE MEDICION DE METODOS  
MICROBIOLOGICOS**

Bqca. QM Alicia I. Cuesta,  
Consultora Internacional de la FAO



## Objetivos de la clase

- ✓ Conceptos de precisión, veracidad o justeza y exactitud en métodos microbiológicos.
- ✓ Estudios de intercomparación: tipos, características generales.
- ✓ Incertidumbre de medición: Concepto, cálculo, expresión en le resultado.



La naturaleza y la forma en que se comportan los microorganismos determina las características de los resultados obtenidos por los métodos microbiológico.

En general la distribución de los microorganismos podría describirse mediante modelos estadísticos, como cantidad de microorganismos por unidad de volumen o peso ( Distribución de Poisson)



**¿ Qué características  
tienen los resultados de medición  
métodos microbiológicos  
cuantitativos cuando los repito?**

**¿ Qué características  
Tienen que tener?**



# Características de los resultados de medición METODOS MICROBIOLÓGICOS CUANTITATIVOS

ISO 5725 (trueness and precision) of measurement methods and results

## **PRECISIÓN:**

proximidad entre resultados de mediciones independientes del mismo mensurando, bajo condiciones estipuladas.



# PRECISIÓN:

## ✓ Repetibilidad (r):

Grado de concordancia entre los resultados de sucesivas ***mediciones del mismo mesurando realizadas en las mismas condiciones de medición.***

(ISO Vocabulario internacional de términos básicos y generales de la metrología: 1993)

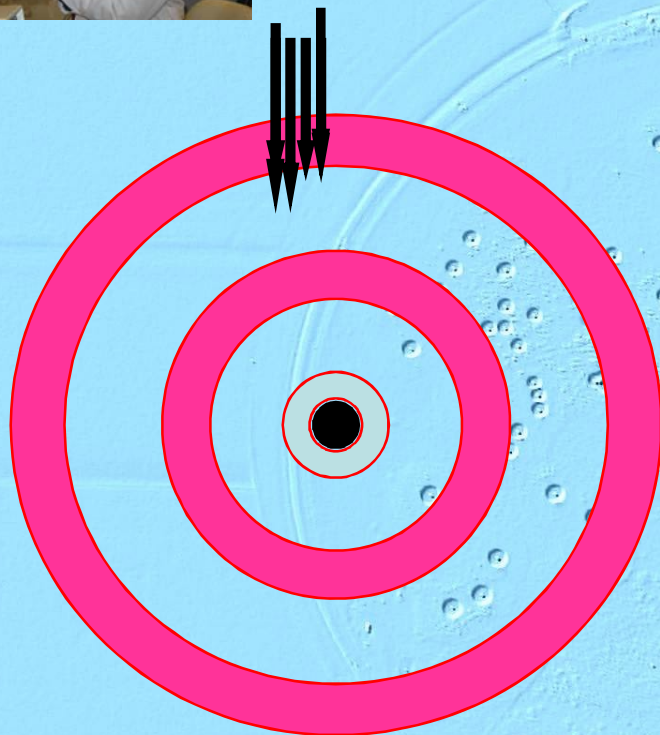
## ✓ Reproducibilidad (R):

Grado de concordancia entre los resultados de sucesivas ***mediciones del mismo mesurando realizadas en diferentes condiciones de medición.***

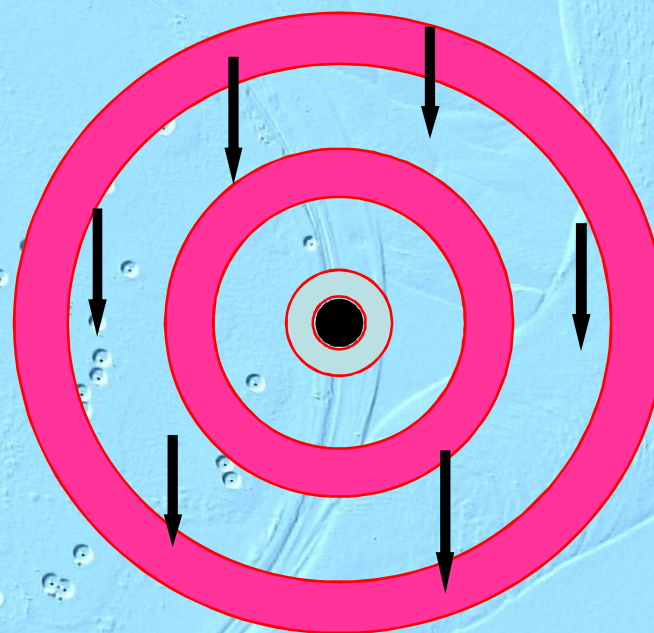
(ISO Vocabulario internacional de términos básicos y generales de la metrología: 1993).



# PRECISIÓN:



Resultados precisos



Resultados imprecisos



## **JUSTEZA O VERACIDAD (“TRUENESS”):**

- **Grado de concordancia entre el promedio de una gran serie de mediciones y el mesurando (ISO 5725).**
- **Proximidad entre el promedio de una gran serie de mediciones y el valor de referencia.**

**SESGO (bias): resultado de la medición menos el valor de referencia o valor asignado.**





✓ **Valor verdadero:** valor en consistencia con la definición de una magnitud

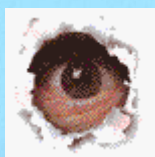
***Concepto abstracto,  
no realizable en la práctica.***

✓ **Error de medición:** resultado de la medición menos el valor verdadero.



# EXACTITUD

Definición: es el grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor del mensurando



**PRECISIÓN  
+  
JUSTEZA**

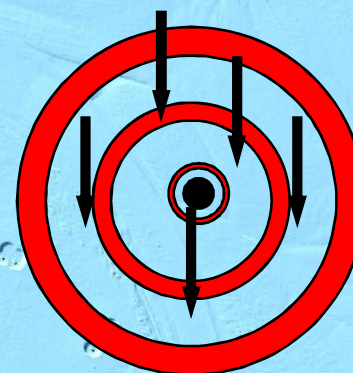
**EXACTITUD**



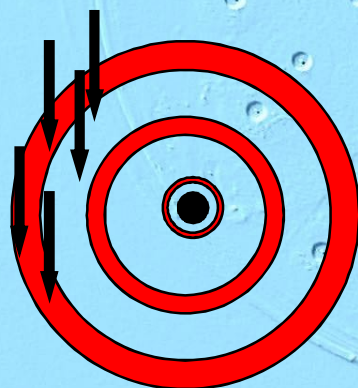
# Ejemplo: Precisión. Justeza y Exactitud



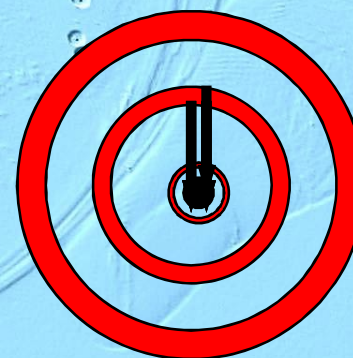
**Resultados precisos y No justos:  
No exactos**



**Resultados imprecisos y justos:  
No exactos**



**Resultados imprecisos y No justos:  
No exactos**



**Resultados precisos y justos:  
exactos**



El laboratorio microbiológico tiene la responsabilidad de garantizar que los resultados que él produce sean ***exactos, validos y confiables***

de modo de poder tomar una decisión acerca de la inocuidad y calidad sanitaria de los alimentos.



<b>CARACTERÍSTICA CUALITATIVA</b>	<b>EXPRESIÓN CUANTITATIVA</b>
<b>JUSTEZA O VERACIDAD ("TRUENESS"):</b>	<b><i>Sesgo (bias),</i></b> desvio, error sistemático
<b>PRECISIÓN:</b> Repetibilidad Reproducibilidad	<b><i>Desviación estándar</i></b>
<b>EXACTITUD</b>	<b><i>Incertidumbre</i></b>



## **Desvío standard experimental**

Es la expresión cuantitativa de la **precisión**.

**En la práctica:**

- ✓ **Calculadora  $\sigma_{n-1}$**
- ✓ **en Excel DESVEST**



## ¿Cómo determino en la práctica el **VALOR VERDADERO?**

- ✓ Valor convencionalmente verdadero, o **valor asignado** o **valor de referencia (vREF)**.
  
- ✓ **El valor asignado o valor de referencia** lo obtenemos de:
  - ❑ Estudios intercomparación (Ensayos de Aptitud Interlaboratorio, Estudios colaborativos)
  - o
  - ❑ Cepas de referencia certificadas (2<sup>da</sup> opción es difícil de obtener en microbiología)



## DESVIO (BIAS)

Cálculo en la práctica es:

Resultado de la medición menos el valor de referencia o asignado.

$$\text{BIAS} = x - v_{\text{REF}}$$





# Ensayos de Aptitud Interlaboratorio Métodos cuantitativos (“Proficiency Testing”):



TABLE 6		<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> - OATMEAL		Sample No: 17F52
ASSIGNED VALUE		Z-Score+2	83,891 cfu g <sup>-1</sup>	
21,000 cfu g <sup>-1</sup>		Z-Score-2	5,257 cfu g <sup>-1</sup>	

Lab ID	Result	Z-Score	Lab ID	Result	Z-Score
1127 A	51,363	1.29 C+	1319	>10	
1127 B	56,800	1.44 C+	1513 A	14,500	-0.54 B-
1127 C	41,818	1.00 C+	1513 B	16,500	-0.35 A-
1134	18,000	-0.22 A-	1517 CV	3,400	-2.64 F-
1165	23,000	0.13 A+	1517 EG	8,800	-1.26 C-
1173 SJB	32,800	0.65 B+	1517 JA	4,600	-2.20 E-
1174 AN	10,000	-1.07 C-	1517 LK	3,200	-2.72 F-
1174 CK	21,000	0.00 A	1517 MP	6,800	-1.63 D-
1174 JB	50,000	1.26 C+	1518 PL	27,400	0.39 A+
1174 LM	8,600	-1.29 C-	1698 GJH	2,400	-3.14
1174 MM	50,000	1.26 C+	1747 BE	48,000	1.20 C+
1202	42,000	1.00 C+	1747 BR	53,000	1.34 C+
1204 CM	14,000	-0.59 B-	1747 CR	43,000	1.04 C+
1204 DM	14,000	-0.59 B-	1747 ER	33,000	0.65 B+
1204 SE	13,000	-0.69 B-	1747 FR	36,000	0.78 B+
1240 Ai	8,760	-1.27 C-	1890	4,590	-2.20 E-
1240 Aii	4,887	-2.11 E-	1915 RM	13,600	-0.63 B-
1240 C	30,000	0.52 B+	1915 SLF	16,500	-0.35 A-
1240 D	<10		2064 A	34,000	0.70 B+
1273 DR	15,000	-0.40 A-	2064 R	34,000	0.70 B+

# ESTUDIOS DE INTERCOMPARACIÓN :



**La intercomparación es una herramienta muy valiosa como evaluación externa cuantitativa de la calidad de los laboratorios.**

Ejemplo ensayos de aptitud interlaboratorio.

- Norma en las que se basan el laboratorio proveedor de interlaboratorio: Guía ILAC G13 o ISO 43.

- Análisis de resultados de los interlaboratorios:

Z-score ISO/DIS13528 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.



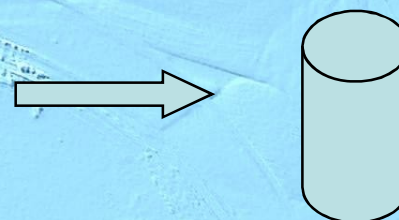
## Proveedor de estudios colaborativos

- ✓ Prepara las muestras con diferentes niveles de analito.
- ✓ Establece el protocolo que deben cumplir los participantes de la intercomparación.  
Instructivo de análisis de muestra, fecha de realización análisis y envío de los resultados, etc.
- ✓ Envía las muestras.



## Ejecución de los ensayos de aptitud:

Es fundamental enviar muestras homogéneas y estables



Se realizan ensayos y pruebas estadísticas **antes del envío** para asegurar la homogeneidad y estabilidad del material enviado.

Los resultados obtenidos por los laboratorios participantes deben ser enviados al organizador quien los evalúa.

El organizador confecciona y envía un informe con información sobre el análisis y evaluación de los resultados de todos los laboratorios participantes.

**Según el objetivo que persiguen  
podemos tener diferentes tipos de  
estudios de intercomparación :**



- ✓ Ejercicios de ensayos de aptitud interlaboratorio.
- ✓ Estudios colaborativos.
- ✓ Estudios de certificación.



## **ENSAYOS DE APTITUD INTERLABORATORIO:**

- ✓ Están **abiertos a todos los laboratorios** que quieran participar y pueden ser obligatorios debido a **procesos de acreditación.**
- ✓ Nos permiten **evaluar la aptitud de un laboratorio para realizar el ensayo.**
- ✓ Se usa como **herramienta de ASEGURAMIENTO DE CALIDAD DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO.**



## **ESTUDIOS COLABORATIVOS:**

- ✓ **Están dirigidos a laboratorios especializados, con experiencia y calidad reconocida.**
- ✓ **Estos laboratorios son seleccionados** por el organismo que gestiona el ejercicio.
- ✓ Cada laboratorio debe seguir en forma estricta un protocolo previamente consensuado para realizar el método.
- ✓ **Los estudios colaborativos permiten VALIDAR MÉTODOS.**

## ESTUDIOS DE CERTIFICACIÓN:



- ✓ **Están dirigidos a laboratorios especializados, con experiencia y calidad reconocida.**
- ✓ **Estos laboratorios son seleccionados por el organismo que gestiona el ejercicio.**
- ✓ **Los estudios de certificación tienen como objetivo la PREPARACIÓN (y posterior comercialización) DE MATERIALES DE REFERENCIA CERTIFICADOS.**



# Evaluación de los resultados obtenidos en los estudios de intercomparación métodos cuantitativos:



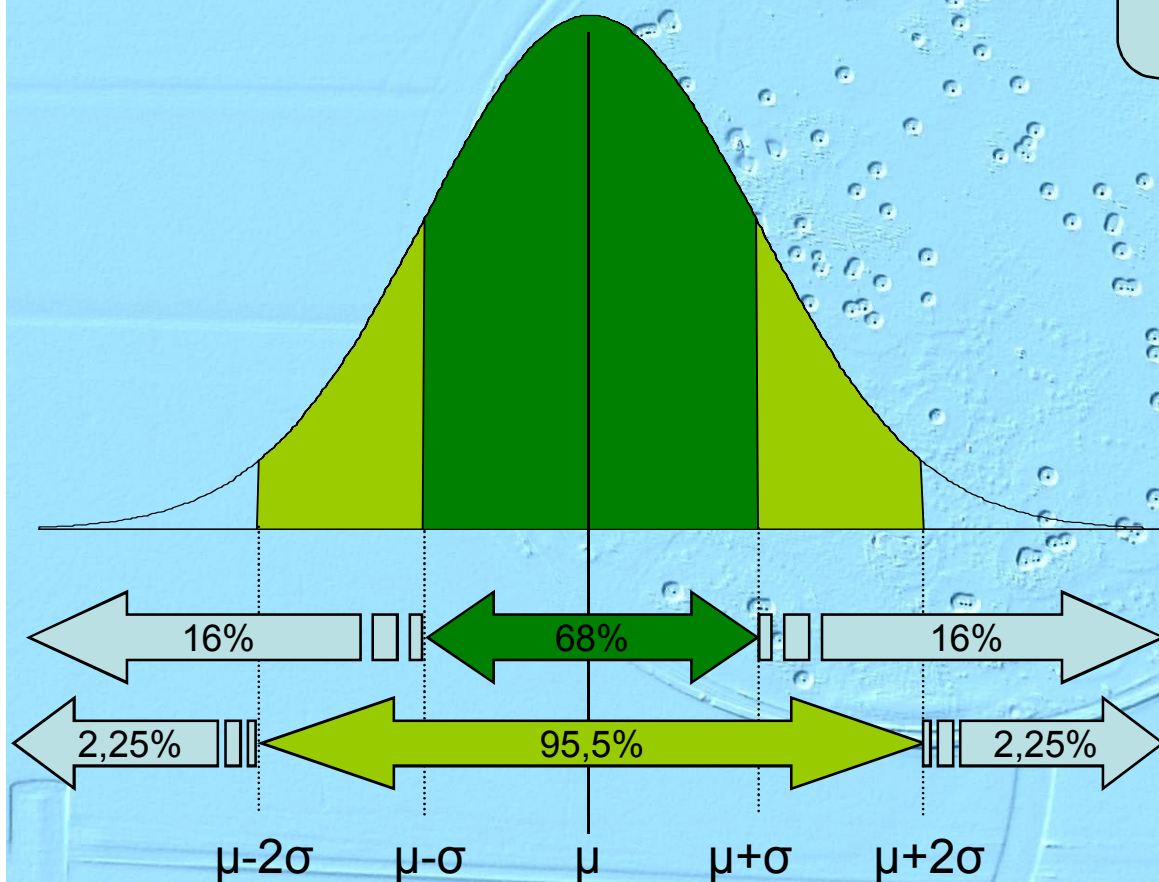
- ✓ Eliminación de los valores aberrantes según Grubbs y Cochran Norma ISO-FIL 135B:1991.
- ✓ Prueba de Z score. ISO/DIS13528 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.



En microbiología  
los valores de ufc/ml o g  
se distribuyen dando  
una curva asimétrica.

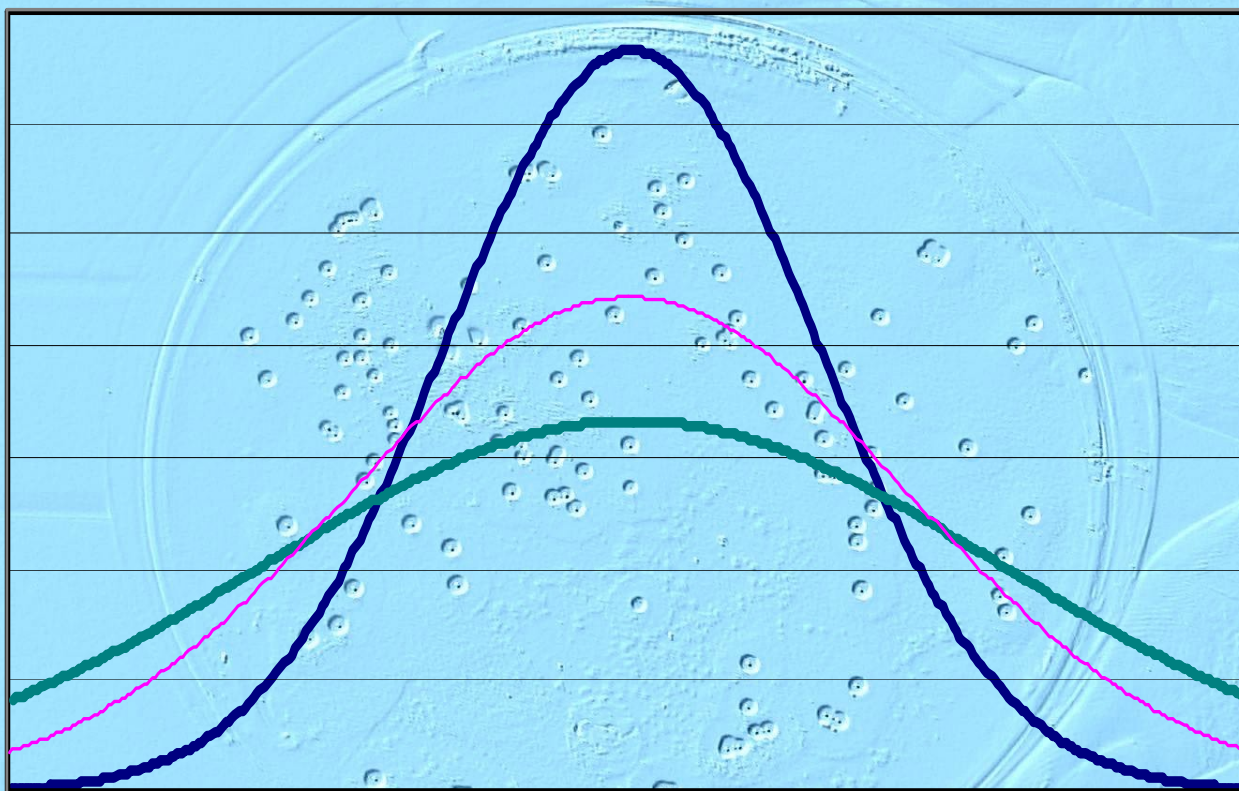
Para normalizarla se usa  
**logaritmo en base 10.**

**DISTRIBUCION NORMAL**



**LOG 10**

La distribución Normal  
está definida  
por  $\mu$  y  $\sigma$



$\sigma$

$\nu$

$\sigma$

$\nu$

$\sigma$

# ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN EN MICROBIOLOGÍA



Definición: la incertidumbre de medición es un parámetro asociado al resultado de la medición, que **caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente asignados al mesurando.**

***NOS PERMITE TENER CONOCER AL MESURANDO.***

# ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN EN MICROBIOLOGÍA



- ✓ Los laboratorios de ensayo deben tener y deben aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de medición.
- ✓ La estimación de las incertidumbres en las medidas y resultados en los laboratorios de microbiología de alimentos es parte importante del control de calidad interno de los resultados obtenidos.
- ✓ Es una indicación cuantitativa de la calidad del resultado  
**INDICA LA CALIDAD DE LA MEDICIÓN**
- ✓ Da idea de la confiabilidad del resultado.



# ¿¿¿¿¿ INCERTIDUMBRE????

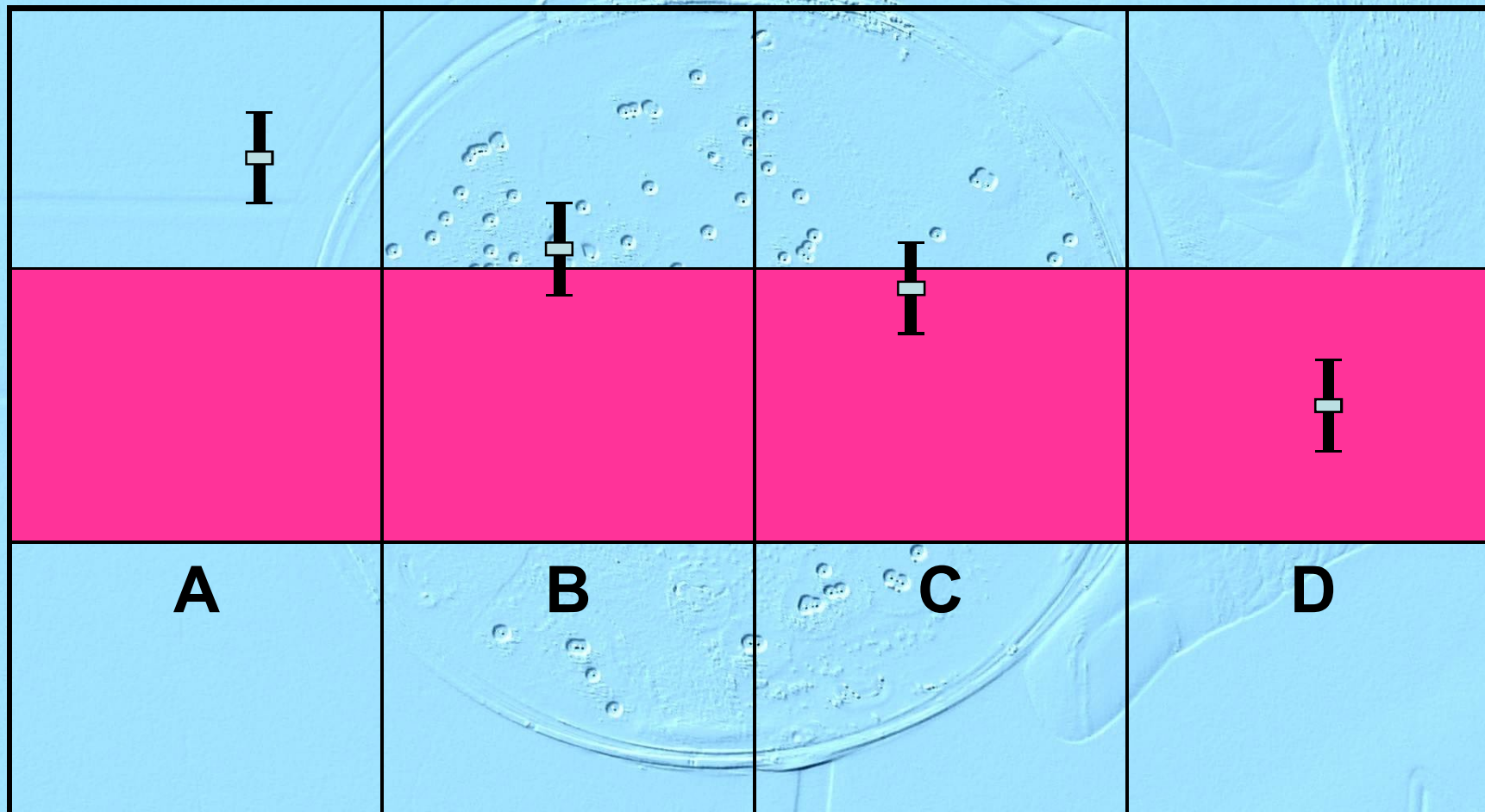
*Pregunta:* ¿ Qué es el resultado de una medición cuantitativa?

*Respuestas:*

1. Un registro de calidad.
2. Un criterio de aceptación rechazo.
3. Una comparación.
4. Un número ( unidades)
5. Ninguna de las anteriores es correcta.

Respuesta correcta es la 5: no es un número sino un intervalo de números.

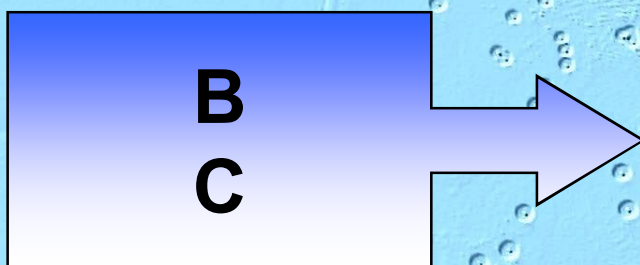
# INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN Y CUMPLIMIENTO DE ESPECIFICACIONES



Rango de especificación



**A** Declaración de no cumplimiento con la especificación.



Limitarse a informar los resultados y su incertidumbre (INDETERMINADO)

**D** Declaración de cumplimiento con la especificación.





***Un laboratorio de ensayo competente debe estar en condiciones de poder brindar una afirmación sobre la incertidumbre de los resultados de los ensayos realizados***



***Primer Paso:***  
**IDENTIFICACIÓN DE LAS  
FUENTES DE INCERTIDUMBRE:**

Se enumeran las posibles fuentes de incertidumbre que pueden afectar el resultado de un ensayo:

**1. TÉCNICAS/INSTRUMENTOS.**

Asociadas:

- ✓ al material de referencia.
- ✓ a la uniformidad de la distribución de los microorganismos en la muestra
- ✓ a la exactitud de los equipos utilizados para establecer medida de masa y volumen.
- ✓ al mezclado de las muestras.
- ✓ al volumen usado.
- ✓ a la calidad de medio de cultivo
- ✓ a las condiciones de incubación
- ✓ a la lectura e interpretación de los resultados
- ✓ a las pruebas confirmatorias

# IDENTIFICACIÓN DE LAS FUENTES DE INCERTIDUMBRE (cont) :



## 2. HUMANAS:

Asociadas:

- ✓ a la lectura de placas.
- ✓ a la experiencia y pericia del personal en la interpretación de los resultados.
- ✓ a la reproducibilidad de las determinaciones por cambio de observadores, a los instrumentos u otros elementos.

# IDENTIFICACIÓN DE LAS FUENTES DE INCERTIDUMBRE (cont)



## 3. AMBIENTALES:

Asociadas:

- ✓ a las condiciones atmosféricas, temperatura y humedad, polvo.
- ✓ a las contaminaciones biológicas.
- ✓ a las vibraciones.
- ✓ interferencias electromagnéticas.



## ***Segundo Paso:***

Formas de cálculo Incertidumbre :

### ***CUANTIFICACIÓN DE CADA COMPONENTE DE LA INCERTIDUMBRE.***

**CASO 1:** Para la cuantificación de la incertidumbre se tiene en cuenta los componentes tipo A y tipo B:

**Evaluación tipo A:** Evaluación estadística de la incertidumbre estándar.

Se estima una desviación estándar, la cual se obtiene estadísticamente utilizando mediciones repetidas, actuales o previas.

**Evaluación tipo B:** Evaluación no estadística de la incertidumbre estándar.

Se utiliza toda la información disponible para calcular la variabilidad de cada fuente de incertidumbre

# Fuentes de información para el cálculo:



- ✓ Datos obtenidos de mediciones previas.
- ✓ Especificaciones del fabricante.
- ✓ Datos provenientes de los certificados de calibración.
- ✓ Datos tomados de manuales, registros, etc.
- ✓ Experiencia o conocimiento general del comportamiento y propiedades relevantes de los materiales e instrumentos.

## Formas de cálculo Incertidumbre (cont):



**CASO 2:** Se calcula la incertidumbre estándar considerando los datos de validación y aseguramiento de calidad del método:

La incertidumbre se estima combinando cuadráticamente la desviación estándar repetibilidad ( $S_r$ ) y de reproducibilidad ( $S_R$ )



## Formas de cálculo Incertidumbre (cont):

Para el caso 1 y 2:

La contribución de los distintos componentes de la incertidumbre deben quedar **expresados como un desvío estándar**

**Tercer Paso:**

**INCERTIDUMBRE COMBINADA ( $u_c$ ):** es la raíz de las varianzas totales.

Ejemplo: caso 2

$$u_c = \sqrt{S_r^2 + S_R^2}$$

**Cuarto Paso:**

**INCERTIDUMBRE EXPANDIDA ( $U_e$ ):** es la incertidumbre total  $u_c$  multiplicada por el factor  $k = 2$ .

$$U_e = u_c \times k$$





***Cuarto Paso (cont):***  
**Expresión del resultado de un ensayo  
y su incertidumbre asociada:**

El resultado (Rdo) se expresa asociado a la Ue.

De la siguiente manera:

**Rdo  $\pm$  Ue** (es un intervalo)



# Expresión de la Incertidumbre en microbiología

**x**

**$1.1 \times 10^4$  ufc/g**

**ucR**

**$\pm 12\%$  ufc/g**

**UeR**

**$\pm 24\%$  ufc/g**

**Resultados**

**$1.1 \pm 0.3 \times 10^4$  ufc/g**

**$0.8 \times 10^4$  a  $1.4 \times 10^4$  ufc/g**

**$1.1 \times 10^4 \pm 24\%$  ufc/g**

**Ejemplo: Recuento total en leche en polvo**

# Documentos para Estimación de la incertidumbre de medición en microbiología



## Referencias:

- EURACHEM / CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement.
- CAEAL. Policy on the Estimation of Uncertainty of Measurement in Environmental Testing.
- NMKL Procedure N° 8 (1999) Measurement of uncertainty in microbiological examination of foods.
- UKAS Publication ref: LAB 12. The Expression of Uncertainty in Testing.
- Seppo 1. Niemela Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms Publication J3/2002ADVISORYCOMMISSION FOR METROLOGY Chemistry Section Expert Group for Microbiology



Con una frecuencia establecida por el laboratorio se revisa, se incorporan nuevos datos y se recalcula la incertidumbre para cada parámetro.

Se elabora un informe conteniendo toda la información relacionada con el cálculo y los resultados obtenidos de incertidumbre para el ensayo.



El cálculo de la precisión y exactitud de un método microbiológico cuantitativo, nos indica la calidad de la medición realizada por el laboratorio y, por lo tanto, nos da idea de la confiabilidad de los resultados.

Como veremos más adelante, dicho cálculo se puede realizar usando los datos obtenidos de los estudios de validación y aseguramiento de calidad.

*Gracias por su atención*

