

CONTENIDO

1	PROPÓSITO	2
2	ALCANCE.....	2
3	BIBLIOGRAFÍA.....	2
4	ABREVIATURAS.....	2
5	DEFINICIONES.....	2
6	DESARROLLO	3
6.1	Selección del método.....	3
6.1.1	Método Normalizado	4
6.1.2	Método No Normalizado	5
6.2	Selección de la matriz	5
6.3	Pruebas preliminares	6
6.4	Establecimiento del Protocolo de Validación o Verificación de Métodos	6
6.5	Diseño experimental	6
6.5.1	Preparación del inóculo	6
6.5.2	Preparación de la muestra	8
6.5.3	Inoculación de muestras	8
6.5.4	Tabla de contingencias	8
6.6	Criterios de Validación y Verificación de Métodos.....	9
6.6.1	Evaluación del desempeño de métodos:	9
6.7	Informe de Validación / Verificación de Métodos.....	13
7	ANEXOS.....	14
7.1	Tabla 7. Categorías de muestras.....	14
7.2	Tabla 8. Etapas y parámetros de validación y/o verificación.....	15
7.3	Ejemplo Younden y Steiner.....	16
7.4	Combinación de valores para la Prueba de Robustez de Younden y Steiner.....	17

1 PROPÓSITO.

Establecer los lineamientos y criterios para la evaluación del desempeño de métodos de diagnóstico y detección de microorganismos patógenos (Métodos cualitativos), aportando evidencia objetiva que permita establecer la veracidad de los resultados particulares para su uso.

2 ALCANCE.

El presente documento es aplicable a todos aquellos laboratorios microbiológicos interesados en coadyuvar con la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera (DGIAAP) del SENASICA y ser reconocida la competencia técnica en métodos para la detección de organismos patógenos en productos vegetales y superficies de contacto vivas e inertes, mediante el cumplimiento de los criterios establecidos en este documento.

3 BIBLIOGRAFÍA

- NMX-EC-17025-IMNC-2018 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración”.
- CRITERIOS DE APLICACIÓN DE LA NORMA NMX-EC-17025-IMNC-2018 / ISO/IEC 17025:2017 de la Entidad Mexicana de Acreditación (ema®).
- UNE-EN ISO 16140 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal – Protocolo de Validación de métodos alternativos (ISO 16140:2016).
- FDA. Guidance for the Industry. Bioanalytical Method Validation. May 2001

4 ABREVIATURAS.

- **AOAC:** Association of Analytical Communities.
- **DGIAAP:** Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera
- **ISO:** International Standardization Organization
- **ema:** Entidad Mexicana de Acreditación
- **FDA:** Food and Drug Administration
- **USDA:** United States Department of Agriculture
- **NOM:** Norma Oficial Mexicana
- **NMX:** Norma Mexicana
- **IMNC:** Instituto Mexicano de Normalización y Certificación

5 DEFINICIONES.

Para el propósito de esta guía, se aplican las siguientes definiciones:

Analito: Componente medido por el método de análisis. En el caso de métodos microbiológicos es el microorganismo, sus componentes o productos asociados (enzimas o toxinas).

Cepas de Referencia: Microorganismo obtenido directamente de una colección de cultivos oficiales y definido por lo menos a nivel de género y especie, catalogado y descrito conforme a sus características y preferiblemente procedente de productos alimenticios o de agua, según corresponda.

Matriz: Es el tipo de muestra la cual puede o no contener al Analito de interés.

Método Normalizado: Aquellos publicados como Normas Oficiales Mexicanas (NOM), Normas Mexicanas (NMX) y los emitidos por organizaciones de normalización, extranjeras, regionales e internacionales; todas reconocidas, tales como FDA, USDA, ISO, etc.

Método No Normalizado: Los métodos, propios o desarrollados por el laboratorio, los métodos obtenidos de publicaciones científicas, así como los métodos normalizados modificados, ampliados o usados fuera de su alcance propuesto.

Método Alternativo: Método de análisis que determina o estima, para una categoría de productos concretos, el mismo Analito que el método normalizado correspondiente; el cual ha sido validado por comparación con el método Normalizado (método confirmatorio).

Método Confirmatorio: Método que se emplea para confirmar los resultados positivos de los métodos alternativos, obteniendo un microorganismo aislado.

Muestra: Cantidad representativa de un total que posee todas las características físicas, fisicoquímicas y microbiológicas del producto que se toma para someterla a estudio, análisis o experimentación.

Microorganismo Diana (Blanco): Microorganismo definido según el alcance del método, que debe ser detectado o enumerado.

Microorganismo No Diana (No blanco): Microorganismo definido según el alcance del método, que no debe ser detectado o enumerado.

Validación del Método: Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista para métodos No normalizados.

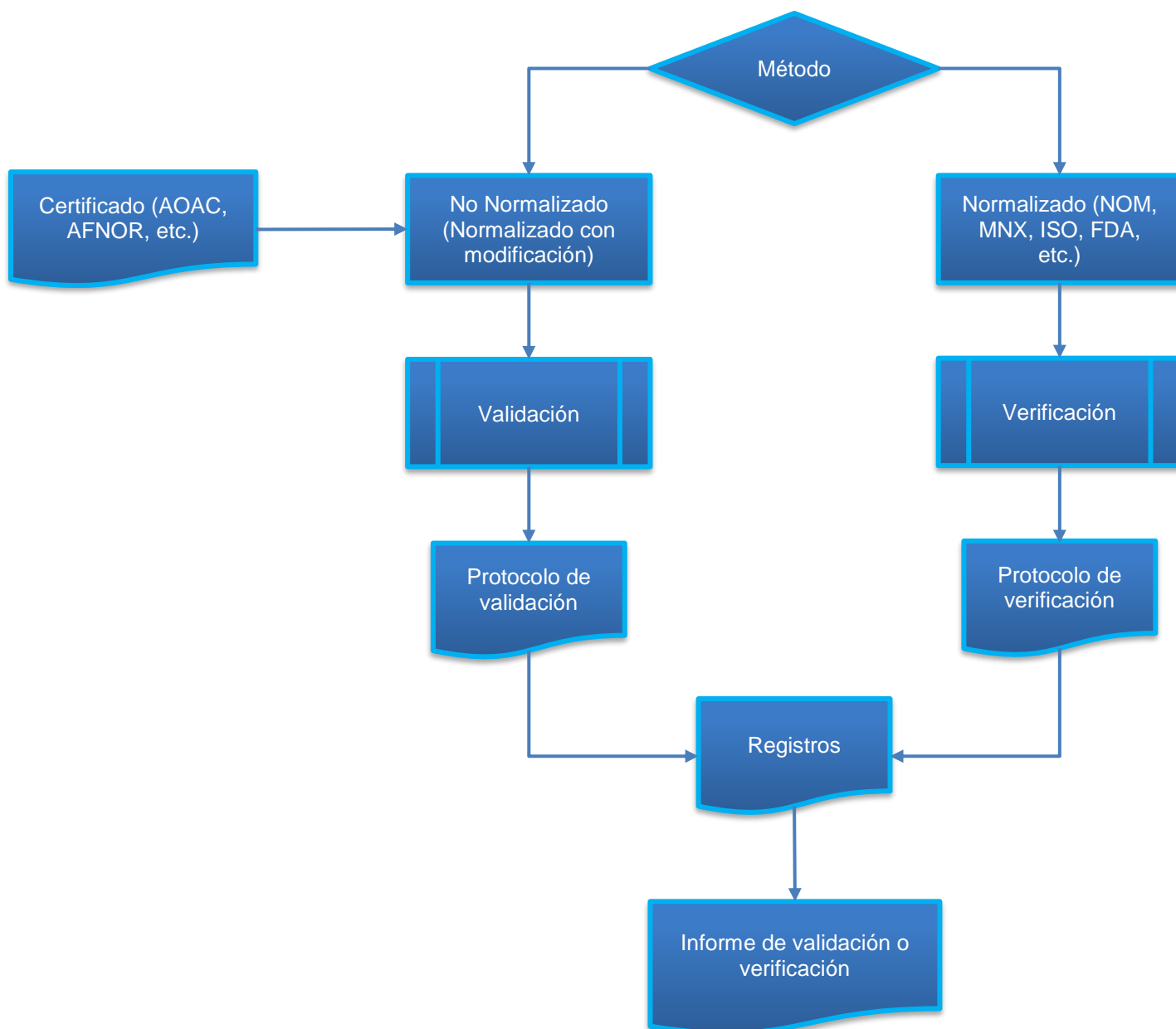
Verificación del Método: Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados para métodos Normalizados.

6 DESARROLLO

6.1 Selección del método

Para verificar o validar un método, es necesario definir el tipo de Método (Normalizado o No Normalizado) con la finalidad de establecer los parámetros de validación o verificación.

Diagrama1. Selección del método



Cualquier cambio al método normalizado requiere una nueva validación.

6.1.1 Método Normalizado

Para métodos o procedimientos normalizados el laboratorio debe realizar y presentar evidencia objetiva de la **verificación del método** para demostrar que cumple las especificaciones de este y cuenta con la competencia técnica para realizarlo adecuadamente, tomando en consideración sus propias instalaciones, equipo y personal.

La verificación del método debe considerar los siguientes criterios:

- Repetibilidad (ver Tabla 8).
 - Eficacia Relativa.
 - Especificidad Relativa.
 - Sensibilidad Relativa.
- Reproducibilidad.
 - Eficacia Relativa.
 - Especificidad Relativa
 - Sensibilidad Relativa

Es importante mencionar que se deben cumplir con las tres repeticiones que se indican en los parámetros (ver etapa 3: repetibilidad).

6.1.2 Método No Normalizado

Para métodos o procedimientos no normalizados, el laboratorio debe realizar y presentar evidencia objetiva de la **validación del método** para demostrar que éste es capaz de detectar el microorganismo de interés.

La validación de estos métodos debe considerar los siguientes criterios:

- Límite de Detección.
- Robustez.
- Repetibilidad (ver Tabla 8).
 - Eficacia Relativa.
 - Especificidad Relativa.
 - Sensibilidad Relativa.
- Reproducibilidad.
 - Eficacia Relativa.
 - Especificidad Relativa.
 - Sensibilidad Relativa.

Los métodos no normalizados se consideran como análisis “Tamiz”, por lo que éstos deberán ser verificados por el método de referencia Normalizado o Confirmatorio (aislamiento del microorganismo; tanto en la validación del método como en el método de rutina, ver punto 6.1.1), para poder emitir resultados confiables y demostrar que el método es equivalente al método Normalizado.

Si no se cuenta con un método de referencia Normalizado para confirmar el método no normalizado, se tomará en consideración el método utilizado como método confirmatorio.

6.2 Selección de la matriz

Los criterios para la selección de matriz en la evaluación del desempeño del método son considerados de acuerdo al siguiente orden de importancia:

- Matrices de la región con mayor probabilidad de analizar.
- Registro histórico de muestras analizadas.
- Categorías de matrices (Ver Anexo 7.1).
- Alertas / Notificaciones sanitarias.
- Vinculación epidemiológica entre la matriz y el organismo diana.
- Programas de Monitoreo y Vigilancia establecidos por el SENASICA.
- Petición explícita del cliente.

6.3 Pruebas preliminares

Es recomendable realizar pruebas preliminares para asegurar (o en su caso controlar) que no existe algún factor que no permita la detección del organismo de interés por el método empleado.

Las pruebas preliminares se realizan para determinar:

- El efecto o interferencia de la matriz sobre el método.
- Evaluar reactivos que van a ser utilizados.
- La preparación de las muestras, etc.

Es necesario documentar todas las actividades realizadas junto con los resultados obtenidos.

Ejemplo:

- Preparación de diluciones.
- Inoculación de muestras
- Preparación de medio de cultivo.
- Procesamiento de muestras.
- Análisis molecular.
- Pruebas bioquímicas.

6.4 Establecimiento del Protocolo de Validación o Verificación de Métodos

Antes de iniciar con la validación o verificación de un método, se debe contar con el “Protocolo de Validación” o con el “Protocolo de Verificación” (Según la selección del método) con la finalidad de planificar y organizar las actividades correspondientes.

Para ello, se deberán definir:

- Objetivo.
- Alcance.
- Personal que participará en las actividades.
- Metodología.
- Diseño experimental.
- Listado de equipos, instrumentos, materiales, medios de cultivo, reactivos y cepas de referencia.
- Método estadístico (Parámetros y criterios de aceptación del método).
- Formatos y Registros asociados.

6.5 Diseño experimental

6.5.1 Preparación del inóculo

La validación y verificación de métodos debe de contemplar el uso de **materiales de referencia** adecuados al alcance de la metodología para dar confiabilidad a los resultados obtenidos en el laboratorio. Por lo tanto, el uso de materiales de referencia es un requisito necesario en los métodos realizados en los laboratorios.

Para realizar las diluciones de los microorganismos diana y no diana que se van a emplear en la validación o verificación, se siguen las indicaciones de trabajo para diluciones bacterianas establecidas en el laboratorio, las cuales deberán tomar en cuenta la verificación de los microorganismos empleando el método normalizado. La verificación de microorganismos no diana, se realizará siempre y cuando se cuente con un método de identificación.

Es importante señalar que para los parámetros de especificidad y sensibilidad relativa (etapas 3 y 4), es necesario considerar las muestras estimadas para cada una de ellas con las inoculaciones del microorganismo diana y no diana.

Para el microorganismo diana la concentración de inóculo debe ser de 10 veces mayor que el límite de detección del método a validar.

Para el microorganismo no diana la concentración de inóculo de cada cepa debe ser 10 veces mayor al nivel del microorganismo diana y emplear como mínimo de 3 microorganismos **no diana** por ensayo, los cuales deben:

No diana N-1: Compartir propiedades similares al microorganismo diana.

No diana N-2: Compartir reacciones bioquímicas similares.

No diana N-3: Competir por recursos al organismo diana.

Ejemplo:

Se contemplan 20 muestras para especificidad y sensibilidad relativa para las etapas 3 y 4 de las cuales, las 10 primeras se deben inocular con 3 microorganismos no diana (verdaderos negativos) y los 10 restantes se deberán inocular con el microorganismo diana (verdaderos positivos) y con los 3 microorganismos no diana (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Inoculación de muestras.

Nivel de inoculación de los Microorganismos							
		Muestras	Diana	No diana 1	No diana 2	No diana 3	
Eficacia Relativa	Especificidad relativa (verdaderos negativos)	1	N/A	1X10 ¹	1X10 ¹	1X10 ¹	
		2	N/A	1X10 ¹	1X10 ¹	1X10 ¹	
		3	N/A	1X10 ¹	1X10 ¹	1X10 ¹	
		4	N/A	1X10 ¹	1X10 ¹	1X10 ¹	
		5	N/A	1X10 ¹	1X10 ¹	1X10 ¹	
		6	N/A	1X10 ¹	1X10 ¹	1X10 ¹	
		7	N/A	1X10 ¹	1X10 ¹	1X10 ¹	
		8	N/A	1X10 ¹	1X10 ¹	1X10 ¹	
		9	N/A	1X10 ¹	1X10 ¹	1X10 ¹	
		10	N/A	1X10 ¹	1X10 ¹	1X10 ¹	
	Sensibilidad relativa (verdaderos positivos)	11	1X10 ¹	1X10 ²	1X10 ²	1X10 ²	1X10 ²
		12	1X10 ¹	1X10 ²	1X10 ²	1X10 ²	1X10 ²
		13	1X10 ¹	1X10 ²	1X10 ²	1X10 ²	1X10 ²
		14	1X10 ¹	1X10 ²	1X10 ²	1X10 ²	1X10 ²
		15	1X10 ¹	1X10 ²	1X10 ²	1X10 ²	1X10 ²
		16	1X10 ²	1X10 ³	1X10 ³	1X10 ³	1X10 ³
		17	1X10 ²	1X10 ³	1X10 ³	1X10 ³	1X10 ³
		18	1X10 ²	1X10 ³	1X10 ³	1X10 ³	1X10 ³
		19	1X10 ²	1X10 ³	1X10 ³	1X10 ³	1X10 ³
		20	1X10 ²	1X10 ³	1X10 ³	1X10 ³	1X10 ³

6.5.2 Preparación de la muestra

La preparación de la muestra debe mantener la microflora nativa presente en la matriz y adicionar las cepas diana y no diana según el parámetro a evaluar.

Los registros de inoculación de muestras deben contener la siguiente información:

- Identificación de la muestra única e irrepetible.
- Identificación de la cepa (lote).
- Cantidad de la muestra.
- Concentración de Inóculo de organismo diana.
- Concentración de Inóculo de organismos no diana.
- Fecha y hora de inicio/término.
- Nombre del personal responsable de la actividad.

6.5.3 Inoculación de muestras

Se debe considerar la microflora nativa presente en las muestras, teniendo en cuenta que los microorganismos no presentan una distribución uniforme de contaminación, así mismo, se puede presentar una inhibición propia de la matriz, un estrés microbiano, o una lesión de los microorganismos, por lo que es necesario realizar una contaminación artificial con el organismo diana, y en su caso la inclusión de organismos no diana según el parámetro a evaluar.

La inoculación de las muestras se realiza en condiciones asépticas, preferentemente dentro de un gabinete de seguridad biológica (Clase II, de acuerdo al tipo de microorganismo).

La inoculación artificial debe asegurar la uniformidad de la contaminación en la matriz, que permita la recuperación del microorganismo en la porción de la matriz utilizada, considerando la cantidad establecida en la metodología.

Durante la ejecución del protocolo de validación se deberán documentar todas las actividades realizadas junto con los resultados obtenidos.

6.5.4 Tabla de contingencias

Al tratarse de pruebas cualitativas los resultados se dan en dos categorías, **Presencia (Positivo) / Ausencia (Negativo)** y se establece una tabla de comparación respecto con el valor esperado y el valor obtenido, por lo que de esta forma se pueden ingresar los datos en una tabla de resultados de validación, donde se realice la captura y análisis de resultados (ver tabla 2).

Tabla 2. Contingencias

Respuesta	Muestra inoculada	Muestra no inoculada
Resultado Positivo	Verdadero positivo (VP)	Falso Positivo (FP)
Resultado Negativo	Falso negativo (FN)	Verdadero Negativo (VN)

Verdadero positivo (VP): Es el resultado positivo de una muestra cuando esta ha sido inoculada con el microorganismo diana o a detectar.

Verdadero Negativo (VN): Es el resultado negativo de una muestra cuando esta no ha sido inoculada con el microorganismo diana o a detectar.

6.6 Criterios de Validación y Verificación de Métodos

6.6.1 Evaluación del desempeño de métodos:

Proceso que se realizará en el laboratorio para demostrar que un método produce consistentemente resultados confiables en las condiciones particulares del laboratorio evaluando los siguientes aspectos y divididos en las etapas 1, 2, 3 y 4 (Ver Anexo 7.2).

6.6.1.1 Límite de detección (LD)

Documentar que el método es capaz de recuperar al microorganismo diana, de muestras inoculadas con un nivel bajo del mismo, menor a 5 Unidades Formadoras de Colonias (UFC's). Ver tabla 8.

$$LD = \frac{VP}{Ni} \times 100\%$$

Dónde:

VP= Verdaderos Positivos de muestras inoculadas.

Ni = Número total de muestras inoculadas (menor a 5 UFC's).

Criterio de aceptación: Mayor o igual al 80%.

6.6.1.2 Robustez

Es la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones deliberadas de las condiciones del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. En este sentido el objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico desarrollado o implementado por el laboratorio, y describir en qué condiciones analíticas (incluidas sus tolerancias), se pueden obtener resultados confiables.

La prueba de Robustez de Youden y Steiner (sugerida), consiste en evaluar un mínimo de cuatro, hasta siete condiciones (Tabla 3), realizando variaciones de las mismas, de tal forma que sea posible calcular el efecto de cada una de las variables haciendo **la media** de los cuatro o siete valores (Tabla 4), que contienen la variable en su valor más alto (**mayúsculas**) y de aquellas que corresponden al valor más bajo (**minúsculas**).

La prueba Youden y Steiner no es el único método estadístico para evaluar la etapa de robustez y el laboratorio puede utilizar cualquier método, siempre y cuando presente la evidencia estadística y este plasmado en su protocolo de informe de validación, así como en su procedimiento si se cuenta con él.

Dependiendo las variaciones que considere pertinentes el laboratorio, estas siempre deben ser coherentes con el método. La robustez no deberá ser empleada como un alcance al método de rutina.

Las muestras deben ser inoculadas con un nivel de ≤ 15 Unidades Formadoras de Colonias (UFC's). Ver tabla 8.

Entre las condiciones analíticas que podrían afectar a un método se encuentran:

- Reactivos.
- Temperatura en grados Celsius (°C).
- Tiempo de incubación o reacción.
- Tipo de matriz (de acuerdo al alcance del método de referencia y del Senasica).
- Otro tipo de condiciones ambientales.

Para realizar el análisis de robustez se aplica la prueba de Youden y Steiner de la siguiente forma:

1. Identificar las condiciones a evaluar, como se observa en la Tabla 3.
2. Colocar el valor nominal el cual se encuentra establecido en el método de prueba.
3. Para determinar las variables, realice un pequeño cambio por encima del valor nominal (valor alto asignado a la letra mayúscula), y otro por debajo del mismo (valor bajo asignado a la letra minúscula), ver Tabla 3. En el caso de condiciones en las que no aplique la asignación de un valor alto o valor bajo con referencia al valor nominal considere realizar una variación, tomando en cuenta el valor alto como equivalente al valor nominal y valor bajo a la variación propuesta. (Ejemplo: considerar la utilización de una condición X por una condición Y, ver condiciones 3 y 4 de la tabla 9 en anexos).
4. Realice la combinación de variables de acuerdo con la Tabla 4 y asigne un total de 3 muestras por cada bloque.

Tabla 3. Condiciones y asignación de variables.

Descripción	Letra	Valor Nominal	Valor Alto	Valor Bajo
Condición 1	A/a	X	A	a
Condición 2	B/b	X	B	b
Condición 3	C/c	X	C	c
Condición 4	D/d	X	D	d
Condición 5	E/e	X	E	e
Condición 6	F/f	X	F	f
Condición 7	G/g	X	G	g

Llevar a cabo la combinación de valores en 8 bloques de 3 muestras cada uno, así como considerar el uso de controles positivos y negativos de acuerdo con la Tabla 4.

Tabla 4. Combinación de variables para la Prueba de Robustez de Youden y Steiner

Bloque \ Condición	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	B	b	B	b	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
*Resultado 1	s ₁	t ₁	u ₁	v ₁	w ₁	x ₁	y ₁	z ₁
*Resultado 2	s ₂	t ₂	u ₂	v ₂	w ₂	x ₂	y ₂	z ₂
*Resultado 3	s ₃	t ₃	u ₃	v ₃	w ₃	x ₃	y ₃	z ₃
Promedio	\bar{s}	\bar{t}	\bar{u}	\bar{v}	\bar{w}	\bar{x}	\bar{y}	\bar{z}

*Los resultados obtenidos se reportan como presencia (1) o ausencia (0) por cada muestra

Criterio de aceptación

Utilice los promedios calculados en la Tabla 4 para obtener un promedio de las variables consideradas como: valores altos (letra mayúscula) y bajos (letra minúscula), tome en cuenta sólo los valores de los bloques donde aparece la variable para realizar su cálculo, ejemplo:

- La variable "A" se encuentra en los bloques 1-4, su promedio se calcula:

$$\bar{A} = \frac{\bar{s} + \bar{t} + \bar{u} + \bar{v}}{4}$$

- La variable "a" se encuentra en los bloques del 4-8, su promedio se calcula:

$$\bar{a} = \frac{\bar{w} + \bar{x} + \bar{y} + \bar{z}}{4}$$

El resultado de cada variable debe ser igual a 1, cuando el método es lo suficientemente robusto para no ser afectado por las variaciones realizadas a cierta condición. De presentarse variables con un valor diferente al esperado, estas deberán considerarse como críticas para el método de prueba (se muestra un ejemplo en el Anexo 7.3).

6.6.1.3 Eficacia Relativa (ER)

Grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método con las muestras inoculadas y las que no están inoculadas.

$$ER = \left(\frac{VP + VN}{N} \right) \times 100\%$$

Dónde:

VP= Verdaderos Positivos de muestras inoculadas.

VN= Verdaderos Negativos de muestras inoculadas.

N = Número total de muestras.

Criterio de aceptación: Mayor o igual a 95%.

6.6.1.4 Especificidad Relativa (ES) (Exclusividad)

Capacidad del método para no detectar al microorganismo diana, en un grupo de microorganismos no diana, cuando este no está presente en la muestra.

$$ES = \left(\frac{VN}{Ns} \right) \times 100\%$$

Dónde:

VN= Verdaderos Negativos de muestras inoculadas.

Ns= Número total de muestras sin inóculo.

Criterio de aceptación: Mayor o igual al 95%. (≥ 95%)

6.6.1.5 Sensibilidad Relativa (SR) (Inclusividad)

Capacidad del método para detectar al microorganismo diana cuando se encuentra presente en la muestra, en una amplia gama de microorganismos no diana.

$$SR = \left(\frac{VP}{Ni} \right) \times 100\%$$

Dónde:

VP= Verdaderos Positivos de muestras inoculadas.

Ni = Número total de muestras inoculadas.

Criterio de aceptación: Mayor igual al 95%.

6.6.1.6 Repetibilidad (R)

Grado de concordancia entre resultados sucesivos e independientes obtenidos por el mismo método empleando un material idéntico bajo las mismas condiciones (aparatos, operadores, laboratorio e intervalos de tiempos cortos, es decir condiciones de Repetibilidad).

En la Tabla 5 se muestra un ejemplo para determinar si se cumple con el criterio de repetibilidad.

Tabla 5. Repetibilidad, realizada por un primer analista.

Etapa 3			
Id. muestra	Matriz	Concentración de organismo Diana (UFC's)	Concentración de organismos No Diana (UFCs)
021	-	0	15
022	-	0	15
023	-	0	15
024	-	0	15
025	-	0	15
026	-	0	15
027	-	0	15
028	-	0	15
029	-	0	15
030	-	0	15
031	-	15	150
032	-	150	1,500
033	-	1,500	15,000
034	-	15,000	150,000
035	-	150,000	1,500,000
036	-	15	150
037	-	150	1,500
038	-	1,500	15,000
039	-	15,000	150,000
040	-	150,000	1,500,000

Criterio de aceptación: Mayor o igual a 95% ($\geq 95\%$).

6.6.1.7 Reproducibilidad (r)

Grado de concordancia entre resultados de análisis individuales en materia de análisis idéntico empleando el mismo método y obtenido por diferentes operadores empleando equipos diferentes (es decir unas condiciones de reproducibilidad).

El análisis es realizado por una o más personas distintas al analista que realizó la prueba de repetibilidad y se evalúan los criterios de Eficacia Relativa, Especificidad Relativa y Sensibilidad Relativa de forma independiente.

En la Tabla 6, se muestra un ejemplo, similar a la Tabla 5, contemplando ahora al o los siguientes analistas contemplados en la validación.

Considerar los datos de la repetibilidad (tabla 5) que fueron obtenidos por el analista 1.

Tabla 6. Reproducibilidad, realizada por el o los siguientes analistas.

Etapa 4			
Id. muestra	Matriz	Concentración de organismo Diana (UFC's)	Concentración de organismos No Diana (UFCs)
041	-	0	15
042	-	0	15
043	-	0	15
044	-	0	15
045	-	0	15
046	-	0	15
047	-	0	15
048	-	0	15
049	-	0	15
050	-	0	15
051	-	15	150
052	-	150	1,500
053	-	1,500	15,000
054	-	15,000	150,000
055	-	150,000	1,500,000
056	-	15	150
057	-	150	1,500
058	-	1,500	15,000
059	-	15,000	150,000
060	-	150,000	1,500,000

Criterio de aceptación: Mayor o igual al 95% de eficacia relativa por cada analista.

6.7 Informe de Validación / Verificación de Métodos

El informe debe reflejar, además de lo especificado en el numeral 6.4:

- Resultados obtenidos expresados de forma ordenada y legible.
- Conclusiones y declaración de conformidad sobre la aptitud del método, fundamentada en la evaluación de los parámetros de desempeño respecto a los criterios establecidos.
- Criterios de revalidación: Indicar los casos en los que será necesario volver a validar el método (todos aquellos que afecten la mano de obra, ambiente, método, materiales y reactivos, mediciones, y los que el laboratorio considere pertinente).

Se deben adjuntar al informe los registros originales de inoculación, procesamiento y análisis de muestra, o hacer referencia de su ubicación y/o resguardo.

El método estadístico utilizado para la evaluación del método debe incluir la eliminación de resultados no concordantes, tales como:

- Controles negativos (sin inocular) que arrojen un resultado positivo, son indicadores de un error del laboratorio/operador.
- Evidencia de no homogeneidad o uniformidad del material inoculado.
- Valores atípicos

7. ANEXOS

7.1 Tabla 7. Categorías de muestras

	MATRIZ	FAMILIA	EJEMPLO
1	Fruta	Frutas de hueso	Durazno
		Frutas pomáceas	Manzana
		Frutas tropicales y subtropicales variadas (piel comestible)	Higo
		Frutas tropicales y subtropicales variadas (piel no comestible)	Papaya
		Frutos cítricos	Naranja
2	Hortalizas	Brasicáceas	Brócoli
		De bulbo	Cebollín
		Cucurbitáceas	Calabazas
		Solanácea	Tomate y chile, etc.
		De hojas verdes	Espinaca y lechuga, etc.
		De tallo	Apio
		Leguminosas	Ejote
3	Frutillas	Bayas y otras frutas pequeñas	Fresas, zarzamoras, uvas, etc.
4	Hierbas aromáticas y especias	Especias	Tomillo
		Hierbas aromáticas	Epazote, albahaca, etc.
5	Superficies de contacto (Vivas e inertes)	Hisopo	-----
		Esponja	-----
6	Otros	Setas	-----
		Brotos de semilla	Germen de alfalfa

7.2 Tabla 8. Etapas y parámetros de validación y/o verificación

ETAPAS DE VALIDACIÓN Y/O VERIFICACIÓN	PARÁMETROS DE VALIDACIÓN Y/O VERIFICACIÓN	MUESTRAS	NIVEL DE INOCULACIÓN	REPETICIONES (Repetibilidad)	TOTAL DE MUESTRAS	TOTAL DE ANÁLISIS	CÁLCULO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Etapa 1	Límite de Detección	10**	≤5 UFCs	N/A	10	10	$LD = \frac{VP}{Ni} \times 100$	Mayor o igual 80%.
Etapa 2	Robustez	24*	≤15 UFCs	N/A	24	24	(Ver numeral 6.6.1.2)	---
Etapa 3. Repetibilidad	Especificidad Relativa	10**	≥15 UFCs (diana) ≥150 UFCs (no diana)	X 3	10	30	$ES = \frac{VN}{Ns} \times 100$	Mayor igual a 95%
	Sensibilidad Relativa	10**		X 3	10	30	$SR = \frac{VP}{Ni} \times 100$	Mayor igual a 95%
	Eficacia relativa	---		---	---	---	$ER = \frac{VP + VN}{N} \times 100$	Mayor igual a 95%
Etapa 4. Reproducibilidad (una semana después como mínimo)	Especificidad Relativa	10**	≥15 UFCs (diana) ≥150 UFCs (no diana)	X 3	10	30	$ES = \frac{VN}{Ns} \times 100$	Mayor igual a 95%
	Sensibilidad Relativa	10**		X 3	10	30	$SR = \frac{VP}{Ni} \times 100$	Mayor igual a 95%
	Eficacia relativa	---		---	---	---	$ER = \frac{VP + VN}{N} \times 100$	Mayor igual a 95%
					74	154		

** Este es el número mínimo, en medida de lo posible realizar un mayor número de muestras.

Considerar los controles positivos y negativos para cada etapa de validación.

7.3 Ejemplo Youden y Steiner.

Ejemplo de combinación mínima de condiciones necesarias para la prueba de Youden y Steiner, basada en una metodología de detección de *Listeria monocytogenes*.

Tabla 9. Condiciones y asignación de valores nominales

	Descripción	Valor Nominal	Valor Alto	Valor Bajo
Condición 1	(A/a) Tiempo de incubación	24 ± 2 hrs	(A) 28 ± 2 hrs	(a) 22 ± 2 hrs
Condición 2	(B/b) Temperatura	30±1 °C	(B) 32 °C	(b) 28 °C
Condición 3	(C/c) Matriz	N/A	(C) Papa	(c) Esponja
Condición 4	(D/d) Medio de cultivo	Fraser	(D) Fraser	(d) UPB "Caldo universal"

7.4 Combinación de valores para la Prueba de Robustez de Youden y Steiner

Tabla 10. Combinación de valores para la Prueba de Robustez de Youden y Steiner con resultados.

Condición		Bloque							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1-	A/a	(A) 28 ± 2 hrs	A) 28 ± 2 hrs	A) 28 ± 2 hrs	A) 28 ± 2 hrs	(a) 22 ± 2 hrs	(a) 22 ± 2 hrs	(a) 22 ± 2 hrs	(a) 22 ± 2 hrs
2-	B/b	(B) 32 °C	(B) 32 °C	(B) 32 °C	(b) 28 °C	(B) 32 °C	(b) 28 °C	(b) 28 °C	(b) 28 °C
3-	C/c	(C) Papa	(c) Esponja	(C) Papa	(c) Esponja	(C) Papa	(c) Esponja	(C) Papa	(c) Esponja
4-	D/d	(D) Fraser	(D) Fraser	(d) UPB	(d) UPB	(d) UPB	(d) UPB	(D) Fraser	(D) Fraser
*Resultado 1		(s1) Presencia	(t1) Presencia	(u1) Presencia	(v1) Presencia	(w1) Presencia	(x1) Presencia	(y1) Presencia	(z1) Presencia
*Resultado 2		(s2) Ausencia	(t2) Presencia	(u2) Presencia	(v2) Presencia	(w2) Presencia	(x2) Presencia	(y2) Presencia	(z2) Presencia
*Resultado 3		(s3) Ausencia	(t3) Presencia	(u3) Presencia	(v3) Presencia	(w3) Presencia	(x3) Presencia	(y3) Presencia	(z3) Presencia
Promedio		$\bar{s}=0.333$	$\bar{t}=1$	$\bar{u}=1$	$\bar{v}=1$	$\bar{w}=1$	$\bar{x}=1$	$\bar{y}=1$	$\bar{z}=1$

Tabla 11. Cálculo del promedio de cada condición de acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 10.

Condición	Bloques asignados	Cálculo	Resultado
A	1-4	$\bar{A} = \frac{\bar{s} + \bar{t} + \bar{u} + \bar{v}}{4}$	0.833
a	5-8	$\bar{a} = \frac{\bar{w} + \bar{x} + \bar{y} + \bar{z}}{4}$	1
B	1-3, 5	$\bar{B} = \frac{\bar{s} + \bar{t} + \bar{u} + \bar{w}}{4}$	0.833
b	4, 6-8	$\bar{b} = \frac{\bar{v} + \bar{x} + \bar{y} + \bar{z}}{4}$	1
C	1, 3, 5, 7	$\bar{C} = \frac{\bar{s} + \bar{u} + \bar{w} + \bar{y}}{4}$	0.833
c	2, 4, 6, 8	$\bar{c} = \frac{\bar{t} + \bar{v} + \bar{x} + \bar{z}}{4}$	1
D	1-2, 7-8	$\bar{D} = \frac{\bar{s} + \bar{t} + \bar{y} + \bar{z}}{4}$	0.833
d	3-6	$\bar{D} = \frac{\bar{u} + \bar{v} + \bar{w} + \bar{x}}{4}$	1

De acuerdo a la Tabla 1, el resultado de las variables A, B, C y D es diferente de 1, por lo que la combinación de éstas variables debe evitarse al momento de ejecutar el método analítico, ya que el método no sería robusto.