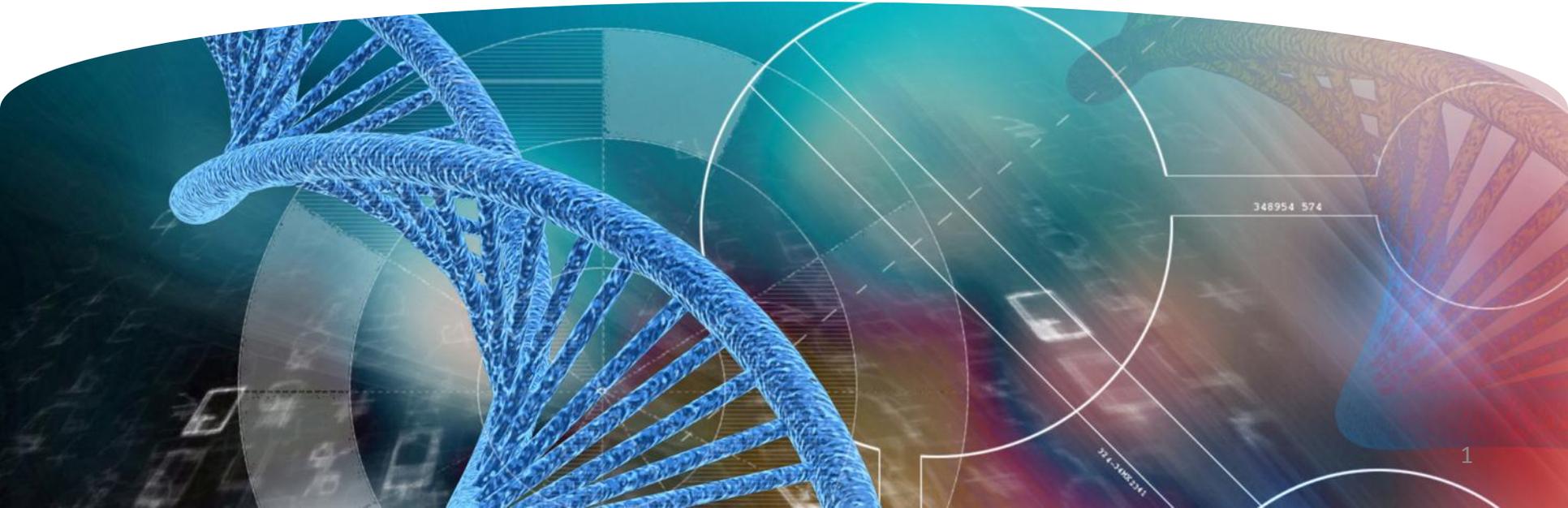




ielab

Making quality control easy



348954 574



# Materiales de Referencia Certificados

## Accreditación Guía ISO 34

### Aplicaciones prácticas



1. ¿Qué es un material de referencia?
2. ¿Qué es un material de referencia certificado?
3. ¿Qué características principales tienen los materiales de referencia microbiológicos desarrollados por Labaqua?
4. ¿Qué son los productos BACuali, BACuanti, BAControl, BACuanti PCR y BACuanti DNA desarrollados por Labaqua?
5. ¿Qué diferencia existe entre los diferentes materiales presentados por Labaqua?
6. ¿Qué proporciona el uso de los materiales de referencia y materiales de referencia certificados?
7. ¿Qué ventajas presentan estos materiales frente a las cepas habituales procedentes de Colecciones de Cultivo?

8. ¿ Son los productos BACuali, BACuanti, BACuanti PCR, BAControl y BACuanti trazables con cepas de Colecciones de Cultivo?
9. ¿En que actividades del laboratorio puedo emplear estos materiales?
10. ¿Es obligatoria la realización de todas estas actividades?
11. ¿Qué es validar un método de ensayo?
12. ¿Cuales son los controles de calidad que debe efectuar un laboratorio?
13. ¿Cuales son los controles de calidad internos que debe realizar un laboratorio?
14. ¿Qué son los controles externos de calidad?
15. ¿Con que periodicidad debe un laboratorio realizar las actividades internas de control de calidad?

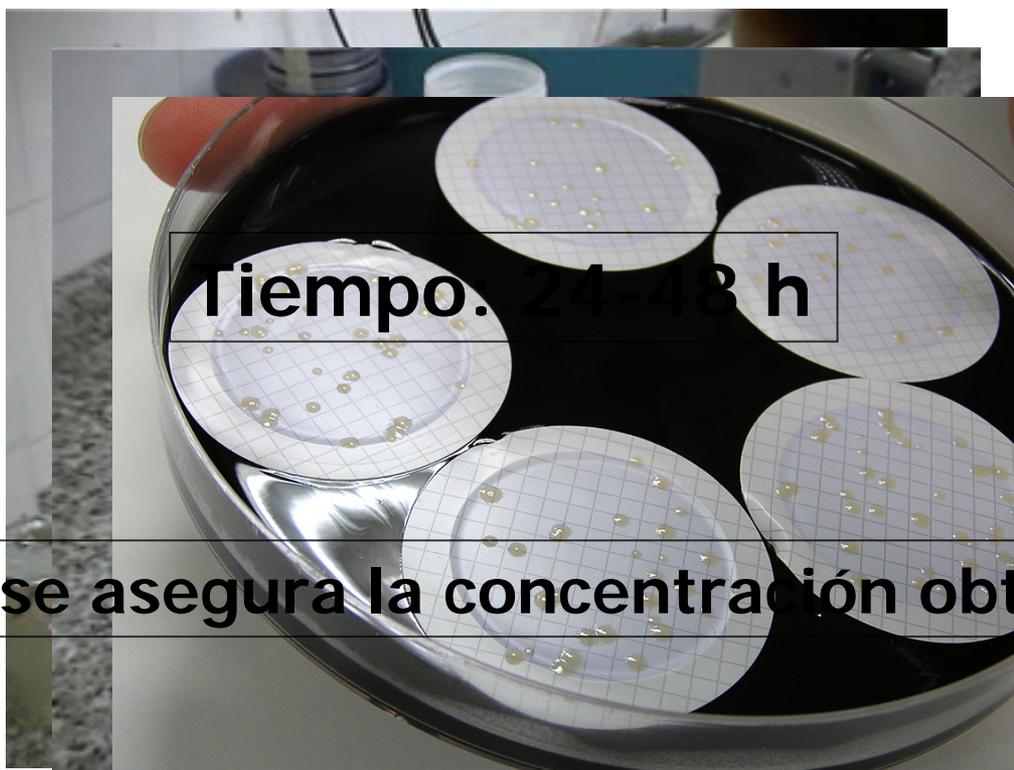
## Un material de referencia debe ser:

- Representativo
- Valor de la propiedad (Identidad)
- Homogéneo
- Estable



# Preparación de suspensiones bacterianas cuantitativas

1. Crecimiento del microorganismo
2. Preparación de diluciones seriadas
3. Incubación y recuento del título

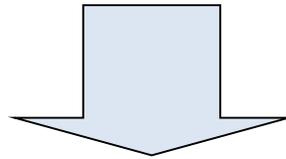


¿Cómo se asegura la concentración obtenida?

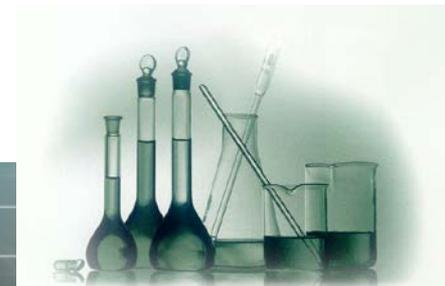


## NUEVOS MATERIALES DE REFERENCIA

### Principales dificultades



- Estabilidad (microorganismos)
- Homogeneidad (bajas concentraciones)



## Desarrollo de un material de referencia microbiológico

**GUÍA ISO 34 "General requirements for the competence of reference materials producers "**

- Fácil de preparar
  - Homogéneo
  - Estable
  - Fácil de usar
  - Aplicable a diferentes microorganismos
- Guía ISO 35 e ISO 13528





BACuanti



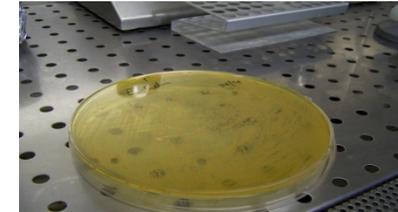
BAControl



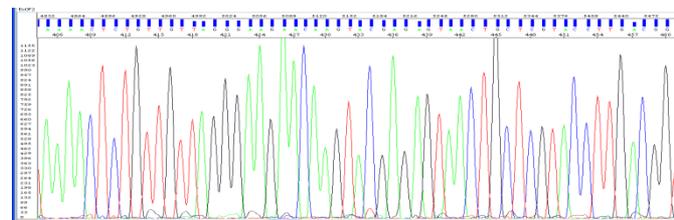
BACuali



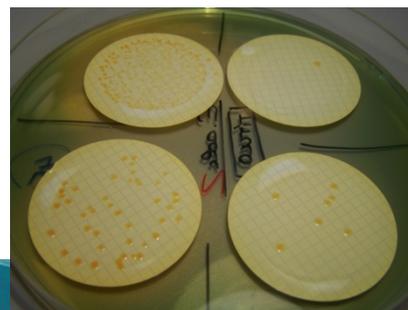
## ➤ Hidratación de la cepa de la Colección de Cultivos Tipo



## ➤ Comprobación de la identidad de la cepa mediante secuenciación del gen rDNA 16S/Análisis bioquímico



## ➤ Realización de la titulación del microorganismo



# Material de Referencia: Preparación II

- Realización de los cálculos a partir del título obtenido

**Pastillas de rango bajo ( $\leq 2$  log)**

**Pastillas de rango medio ( $> 2\log; < 3\log$ )**

**Pastillas de rango alto ( $\geq 3$  log)**

- Preparación y dispensación de una mezcla homogénea:  
“Caldo de mantenimiento” + suspensión bacteriana



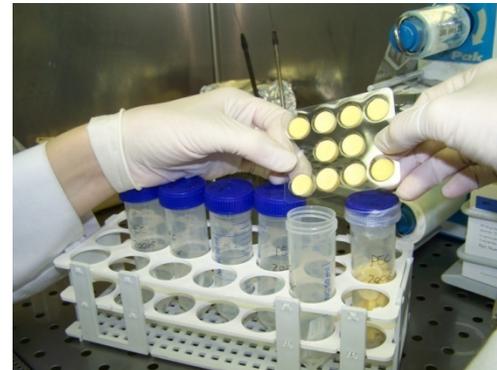
## ➤ Proceso de estabilización (liofilización)



## ➤ Resultado: PASTILLA



## ➤ Desemblastado y conservación a $-18^{\circ}\text{C}$



## 1. Reconstitución del Material de Referencia



## 2. Controles de contaminación cruzada



## 3. Homogeneidad

$$\sqrt[3]{n}$$

10 pastillas, 2 réplicas de cada pastilla

**ISO Guide 35:** Reference materials - General and statistical principles for certification

❖ **ANOVA**   $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}; p\text{-valor} > 0.05$

### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre pastillas	0.0091	9	0.0010	2.0707	0.1361	3.0204
Dentro de las pastillas	0.0049	10	0.0005			
Total	0.0140	19				

## 3. Homogeneidad

1. Verificar que  $MS_{among} > MS_{within}$

2. Calcular la desviación estándar entre unidades ( $s_{bb}$ ), que es igual a la raíz cuadrada de la varianza entre unidades ( $s_A^2$ ), como:

$$s_{bb}^2 = s_A^2 = \frac{MS_{among} - MS_{within}}{n_0}$$

Donde:

$s_{bb}^2$  = Cuadrado de la desviación estándar entre unidades

$MS_{among}$  = Promedio de los cuadrados entre unidades

$MS_{within}$  = Promedio de cuadrados dentro de unidades

$n_0$  = Número de réplicas ensayadas

$s_A^2$  = Varianza entre unidades



### 3. Homogeneidad

3. Calcular la desviación estándar de repetibilidad ( $s_r$ ) a partir de  $MS_{within}$

$$s_r = \sqrt{MS_{within}}$$

$MS_{within}$  = Promedio de cuadrados dentro de unidades

4. Comparar  $s_{bb}$  con  $s_r$

- a) Si  $s_{bb} > s_r$  emplear  $s_{bb}$  como desviación estándar entre unidades (pastillas/viales) ( $s_{bb}$ ) y utilizar este valor como incertidumbre estándar debida a la inhomogeneidad entre viales ( $u_{bb}$ )



## 3. Homogeneidad

### 4. Comparar $s_{bb}$ con $s_r$

b) Si  $s_{bb} < s_r$  hay una influencia importante de la  $s_r$  sobre la  $s_{bb}$  (limitada repetibilidad del método de ensayo) y calcular la incertidumbre estándar debida a la inhomogeneidad entre viales ( $u_{bb}$ ) como sigue:

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{within}}{n} * \frac{2}{v_{MS_{within}}}}$$

Donde:

$MS_{within}$  = Promedio de cuadrados dentro de unidades

$n$  = Número de réplicas ensayadas

$u_{bb}$  = incertidumbre estándar debida a la inhomogeneidad entre viales

$v_{MS_{within}}$  = Grados de libertad para  $MS_{within}$



## 4. Estabilidad

### **Estudio inicial de estabilidad a corto-plazo**

El objeto de este estudio es seleccionar las condiciones de envío más apropiadas, de modo que la contribución de la estabilidad a corto-plazo sea despreciable.

Se toman dos pastillas/viales a 1, 2, 3, 4, 5 días de incubación a  $-18^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  y temperatura ambiente y se analizan por triplicado.

## Resumen

## 4. Estabilidad

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0.32059
Coeficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.10278
R <sup>2</sup> ajustado	0.06200
Error típico	0.04103
Observaciones	24

## ANOVA de la regresión

### ANÁLISIS DE VARIANZA

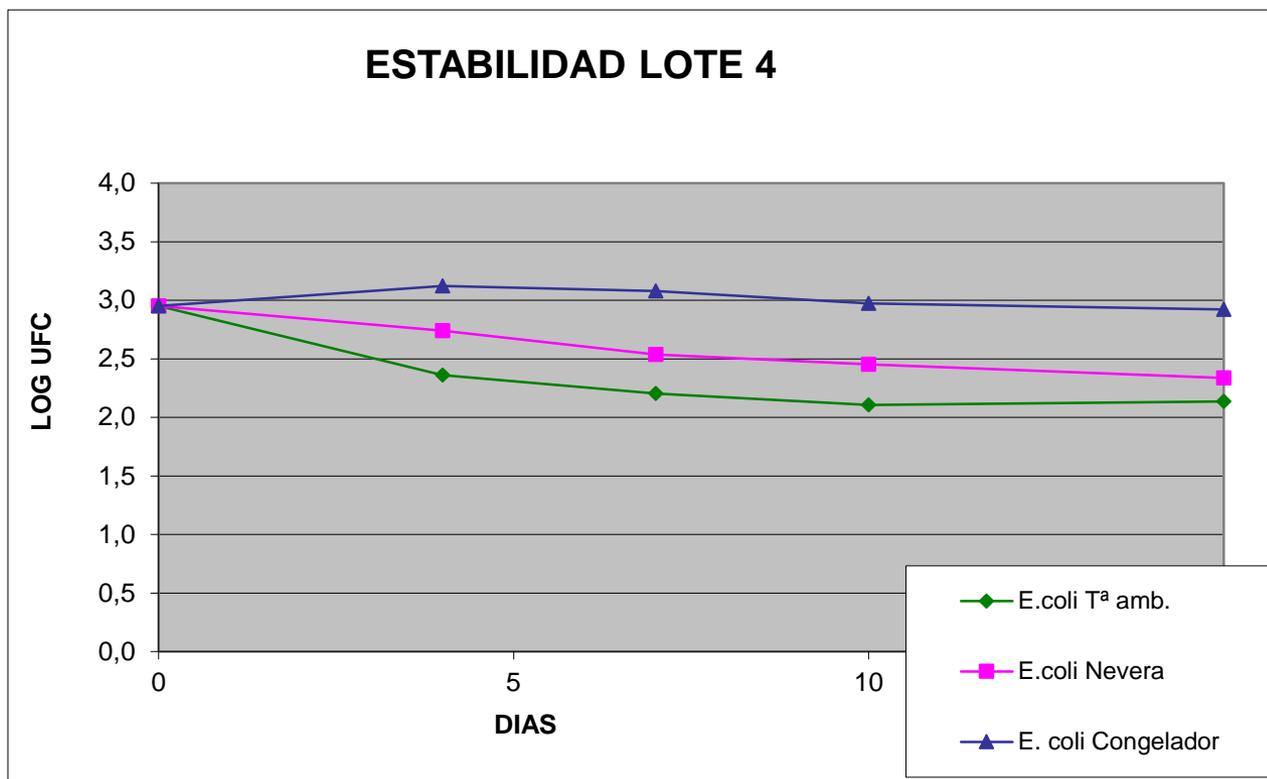
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0.00424	0.00424	2.52019	0.12667
Residuos	22	0.03704	0.00168		
Total	23	0.04128			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Ordenada origen	1.78870	0.02052	87.18653	0.00000	1.74615	1.83125	1.74615	1.83125
Pendiente	-0.01189	0.00749	-1.58751	0.12667	-0.02743	0.00364	0.02743	0.00364

## 4. Estabilidad

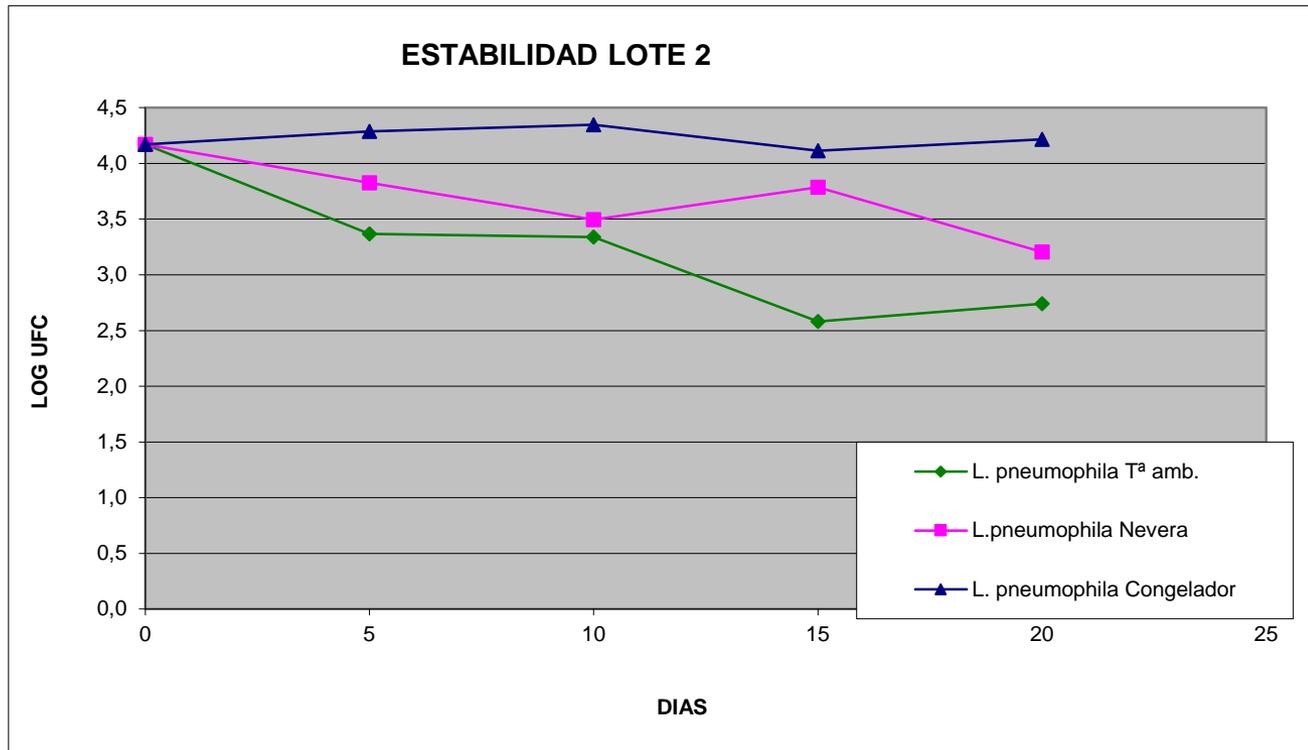
*Escherichia coli*

**ESTABILIDAD LOTE 4**



## 4. Estabilidad

### *Legionella pneumophila*



## 4. Estabilidad

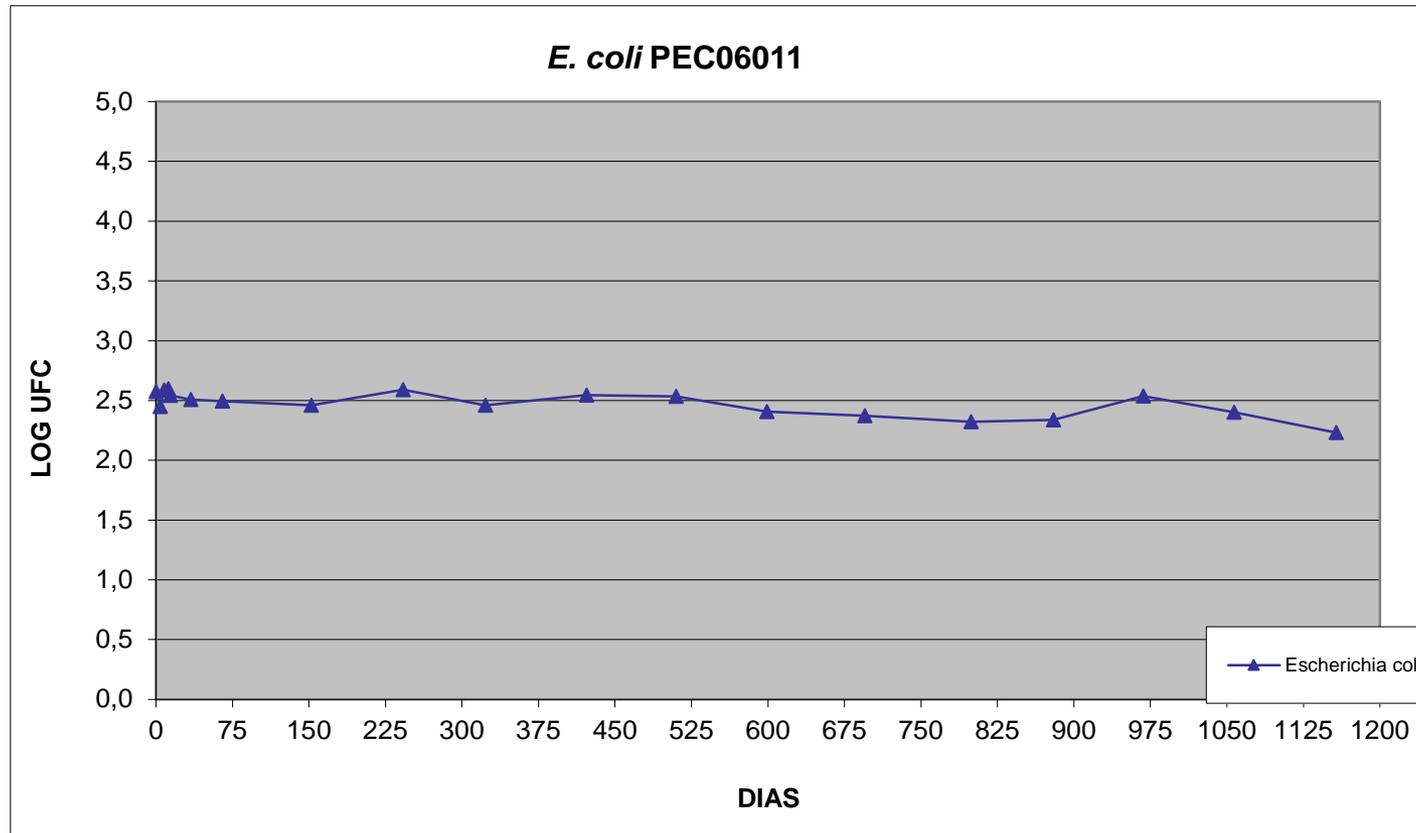
### Estudio inicial de estabilidad a largo-plazo

El material conservado a la temperatura seleccionada en el estudio a corto-plazo, es analizado según las siguientes condiciones:

1. Elegir, de entre todas las pastillas/viales de un lote, dos completamente al azar.
2. Disolver independientemente cada una de las dos pastillas/viales seleccionadas y tomar tres porciones de forma aleatoria cada una de ellas.
3. Analizar en condiciones de repetibilidad y de un modo aleatorio cada una de las 6 réplicas seleccionadas al azar.
4. Este ensayo se efectuará durante X días, repitiendo el ensayo cada X días.

## 4. Estabilidad

*Escherichia coli*



## 4. Estabilidad

### Estudio de estabilidad de nuevos lotes

1. Estudio de estabilidad a corto plazo  
(2 pastillas, 2 veces/semana, 3 semana)
2. ANOVA de la regresión  $F_{\text{cal}} > F_{\text{crit}}$  ( $p > 0.05\%$ )
3. Comparación con rectas históricas de estabilidad a largo-plazo  
(Comparación de pendientes)
4. Verificación de la estabilidad (2 pastillas por triplicado/trimestre)

$$|x_{\text{CRM}} - x_{\text{meas}}| \leq k \sqrt{u_{\text{CRM}}^2 + u_{\text{meas}}^2}$$

## 4. Estabilidad

**Evaluación de la incertidumbre de estabilidad a corto-plazo**

$$U_{sts} = s_b \times t$$

**Evaluación de la incertidumbre de estabilidad a largo-plazo**

$$U_{lts} = s_b \times t$$

**Evaluación de la incertidumbre de la tendencia de las rectas**

$$U_{stend} \quad U_{ltend}$$

Incremento/decremento en el valor de la propiedad distribución rectangular

## Condiciones:

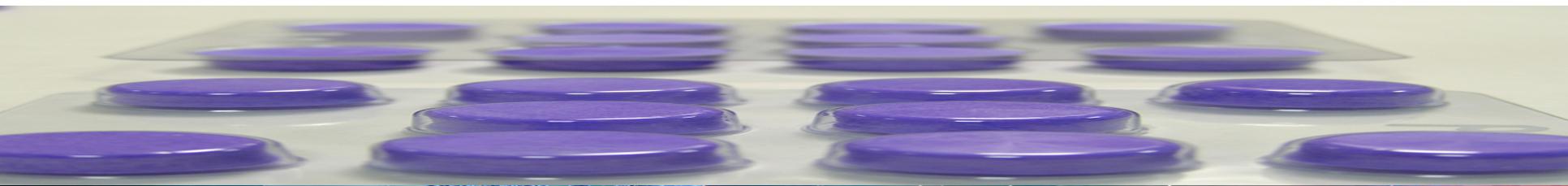
- Siete laboratorios acreditados por ENAC
- Dos pastillas por triplicado
- Identicas condiciones de ensayo, marcadas por el proveedor

## Análisis de los resultados:

- Evaluación inicial
- Transformación logaritmica
- Verficación de la normalidad de la población
- Detección de outliers
- ANOVA
- Incertidumbre de caracterización

$$u_{char} = \frac{s}{\sqrt{p}}$$

$$u_{char} = \sqrt{\frac{s_L^2}{p} + \frac{s_r^2}{np}}$$



## Incertidumbre del material de referencia:

Asumiendo la independencia de las variables, la incertidumbre asociada con el valor de la propiedad de un material de referencia (MR) puede expresarse como:

$$u_{MR} = k \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2 + u_{ltend}^2 + u_{sts}^2 + u_{stend}^2}$$

## BACuanti


**CERTIFICADO  
DE ANÁLISIS**


## BACuanti

**Certifica**

ielab Calidad, S.L.  
C/ Dracma, 16  
Pol. Ind. Las Atalayas  
03114 Alicante (España)  
T+34 966 10 55 01 - F+34 966 10 55 03

**Descripción**

**Código:** I060045  
**Microorganismo:** *Clostridium perfringens* V24  
trazable con ATCC 13124, con un pase  
desde la cepa liofilizada empleada  
**Lote nº:** PCP11023  
**Fecha de preparación:** 11/02/2013  
**Fecha de caducidad:** 03/09/2013

**Pruebas de autenticidad**

Batería de pruebas bioquímicas

**Información de seguridad**

Grupo de riego 2

**Uso preferente**

Validación de métodos microbiológicos.  
Preparación de muestras de referencia de  
trabajo para uso en análisis internos de  
laboratorio.

**Condiciones de reconstitución**

**Diluyente:** Agua estéril  
**Volumen:** 20 mL  
**Tiempo de reconstitución:** 10 minutos

**Condiciones de conservación**

Conservar a  $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$

**Estudio de Certificación**  
(Condiciones de ensayo)

**Laboratorios:** Siete laboratorios acreditados  
según norma ISO 17025  
**Diluciones:** Hasta  $10^1$   
**Volumen analizado:** 1 mL  
**Técnica:** Filtración  
**Temperatura de incubación:**  $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$   
**Tiempo de incubación:**  $24 \pm 2$  horas  
**Medio de cultivo:** Agar base perfringens +  
TSC  
**Membranas de filtración:** Ésteres de celulosa

**Controles de calidad**

**Contaminación cruzada:** Correcto  
**Homogeneidad:** Homogéneo (Guía ISO 35)  
**Estabilidad:** Estable (Guía ISO 35)

**Resultados**

**Porcentaje del lote analizado:** 13%  
**Valor certificado por pastilla:**  $8,87 \times 10^3$  ufc  
**Incertidumbre:** 1,69%  
**Intervalo de confianza 95%:**  $5,97 \times 10^3$  -  
 $13,2 \times 10^3$  ufc

Alicante, 03 de marzo de 2013.

Vicente Catalán Cuenca  
Director de Producto

## 1. Control de calidad de medios de cultivo



## 2. Aseguramiento de la calidad



“El laboratorio debe tener procedimiento de control de la calidad de modo que pueda verificar la validez de los ensayos y calibraciones que realiza”.

## ✓ **Control de calidad externo:** Ejercicios de intercomparación (PTs)

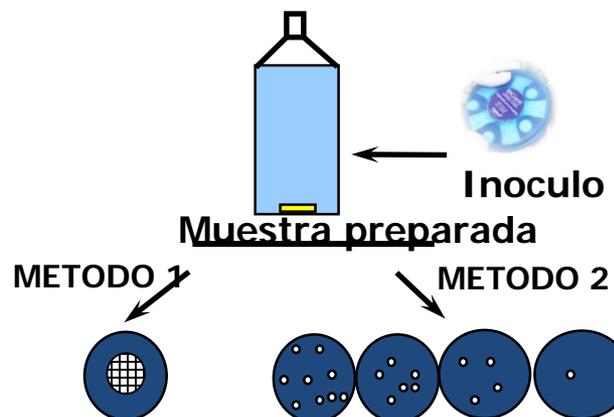
Importancia de la gestión de PTs:

- Preparación de muestras
- Envío a los participantes
- Interpretación y uso de los resultados



## ✓ **Control de calidad interno:**

- Verificación entre analistas
- Control de proceso
- Gráficos de control



**1. Control de calidad de medios de cultivo**

**2. Aseguramiento de la calidad**

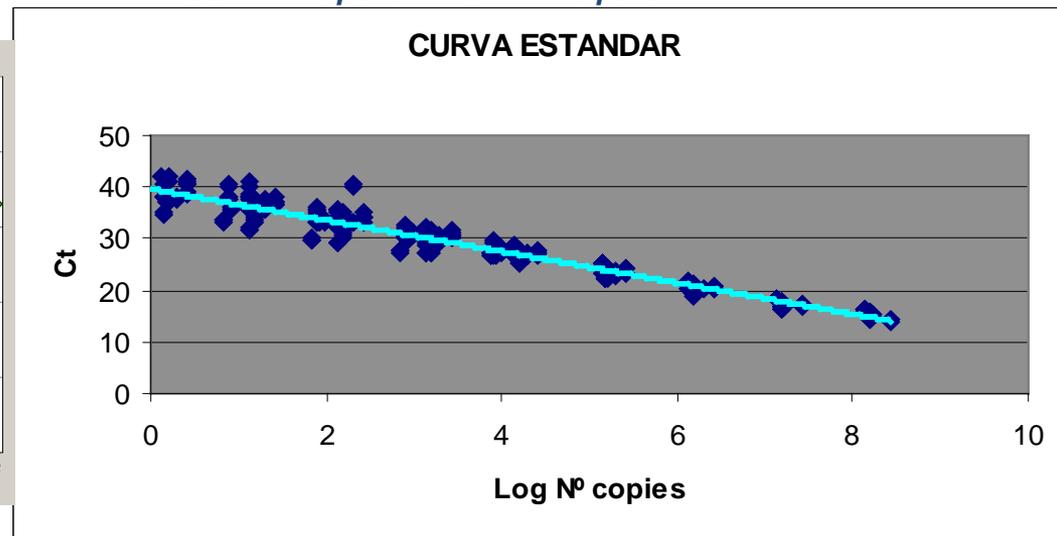
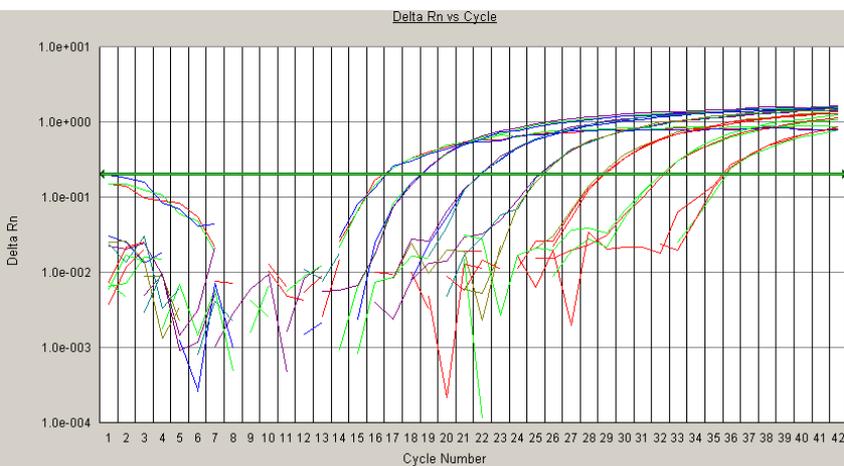
**3. Calibración y verificación de equipos**



# Aplicaciones prácticas Materiales de Referencia: Rectas de calibrado

$$Ct = -3,03 \log[\text{DNA}] + 39,61$$

$$R^2 = 0,95 \quad r = -0,97$$



507 ptos

**1. Control de calidad de medios de cultivo**

**2. Aseguramiento de la calidad**

**3. Calibración y verificación de equipos**

**4. Validación de Métodos**



1. Utilidad de los MR y MRC comerciales
2. Importancia de prepararlos siguiendo los criterios de la Guía ISO 34
3. Múltiples aplicaciones



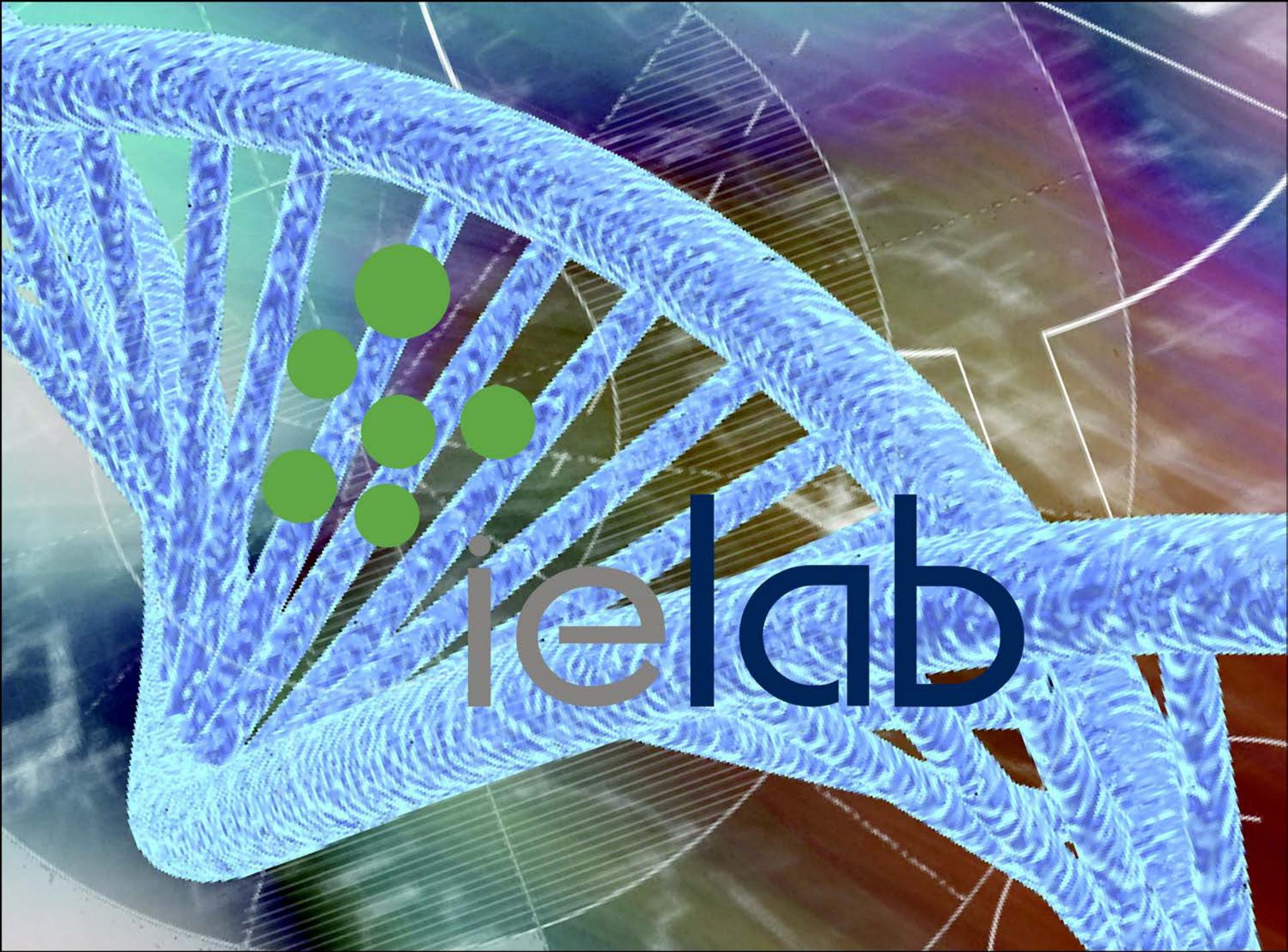
Telf. +34 966 10 55 01  
Fax +34 966 10 55 03

[www.ielab.es](http://www.ielab.es)  
[comercial@ielab.es](mailto:comercial@ielab.es)

Vicente Catalán

Telf. +34 610 23 02 91  
Email [v.catalan@ielab.es](mailto:v.catalan@ielab.es)





ielab