

## **1. Introducción.**

El análisis microbiológico tiene importancia en distintos campos de actividades tales como salud pública, tecnología de alimentos y medio ambiente. En El Salvador los laboratorios encargados de llevar a cabo la evaluación microbiológica trabajan en un entorno de creciente exigencia y responsabilidad, tanto legal como social, que reclama un alto nivel de calidad y de confianza. Por ello, tanto los métodos de ensayo como los laboratorios que realizan los análisis deben asegurar, la veracidad de los resultados.

Esto implica que, además de cumplir los criterios técnicos que aseguren su validez, deben ser realizados con una serie de garantías, que permitan obtener resultados comparables, independientemente del laboratorio que los ejecute, esto incluye pero no se limita a:

- Mediciones analíticas que satisfagan requerimientos acordados.
- Métodos y equipos que hayan sido probados para asegurar que son aptos para el propósito o fin previsto.
- Personal responsable de las mediciones que demuestre ser competente y calificado.
- Participación en programas de verificación externa de la competencia para asegurar que las mediciones analíticas realizadas en el laboratorio son consistentes a las que se realizan en otro lugar.
- Disposición de procedimientos bien definidos para el control y aseguramiento de la calidad y el uso de la información de control de calidad generada.

Dado que la validación de métodos es un requisito establecido en la norma ISO/IEC 17025:2005 se requiere de homologar los conceptos a forma de que se establezcan criterios de trabajo en el campo de la validación de métodos microbiológicos que puedan ser usados por los laboratorios acreditados o que soliciten la acreditación, así como por los evaluadores de acuerdo a los lineamientos de la ISO IEC 17025:2005 y las políticas de OSA. Esta guía constituye el primer trabajo en este sentido y pretende abrir el camino a la emisión de otros documentos que orienten los esfuerzos para demostrar competencia en este campo de aplicación.

## **2. Objeto y Campo de Aplicación**

Establecer los criterios y lineamientos para la validación de métodos aplicados en laboratorios que realizan ensayos microbiológicos.

Nota 1. Este documento no constituye una metodología para la validación de métodos de ensayo microbiológicos. Se indican lineamientos que faciliten tanto la implantación de los aspectos aquí recopilados, como su evaluación por parte de los miembros del equipo evaluador del OSA.

### **3. Alcance**

Esta guía la deben aplicar los laboratorios de ensayo acreditados por **el OSA** y los que soliciten la acreditación, los evaluadores y expertos técnicos que participan en los procesos de acreditación.

Nota 2. Se establecen lineamientos para métodos cualitativos y cuantitativos.

Nota 3. Dado que este documento es de aplicación de laboratorios acreditados o en proceso de acreditación que emplean métodos microbiológicos en distintos campos se han incluido lineamientos para el trabajo que se realiza en el análisis de medicamentos, agua, alimentos y ha dedicado un apartado para los métodos basados en el Numero Más Probable .

### **4. Políticas**

- Los lineamientos presentados en este documento corresponden a parámetros de desempeño mínimos que deben llevar a cabo los laboratorios. Esto no limita que pueda aplicar otros parámetros para la demostración de la competencia, siempre que sean técnicamente justificados.
- Antes de cada validación el laboratorio debe verificar que se cumplen los requisitos técnicos especificados en la norma ISO IEC 17025:2005 y los establecidos por el OSA para garantizar la confiabilidad de los resultados.
- La validación de métodos se requiere en los casos que el laboratorio presente la solicitud para la acreditación ante OSA, gestione la ampliación de alcance de la acreditación, inclusión de nuevas matrices en un método previamente acreditado, cambios en el uso entendido del método, modificaciones relevantes en las condiciones de realización del método entre otros.
- Los microorganismos de prueba utilizados deben proceder de colecciones nacionales o internacionales certificadas o en su defecto de microorganismos aislados por el laboratorio siempre que demuestre su pureza, identidad y viabilidad. Teniendo en cuenta que solamente podrán usarse hasta 5 pases de la cepa.
- Cada método de análisis debe contar con un protocolo de validación en concordancia con el procedimiento de validación del laboratorio. El procedimiento de validación debe corresponder al tipo de método y matriz en la que se realicen los ensayos.
- El protocolo de validación debe contener suficiente información sobre el procedimiento para cada prueba, el tratamiento estadístico de la información generada y los criterios de evaluación. Debe incluirse detalles sobre preparación de las muestras, inóculos y de cualquier insumo relevante en las actividades detalladas. Este documento debe contener suficiente información que permita identificar los elementos de cada validación (equipo, reactivos, personal, condiciones ambientales y métodos). Debe incluir la conclusión sobre la evaluación del desempeño.

**SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD**  
**PO 9.4 POLÍTICA PARA LA VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**  
**DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**  
**VERSIÓN 1            REVISIÓN 0**  
**APROBADO 12/11/14**

- Se debe asegurar que se han efectuado las evaluaciones apropiadas a los medios de cultivo empleados en las actividades (puede consultarse los criterios establecidos en ISO TS 11133-2, en su versión vigente Microbiología de alimentos para consumo humano y animal, parte II guía práctica para los ensayos de rendimiento de medios de cultivo).
- Para métodos cualitativos deben emplearse cepas control negativo y positivo de acuerdo al tipo de muestras o lo indicado en los métodos particulares.
- En los métodos cuantitativos pueden usarse mezclas de microorganismos.
- Deben revisarse los lineamientos para la validación y el control de calidad de los ensayos que están contenidos en las referencias de los mismos.

**5. Referencias.**

- ISO TS 11133:2014 Microbiology of food, animal feed and water -- Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- ISO/TS 11133-2:2003/Amd 1:2011 Test microorganisms for commonly used culture media
- ISO 16140:2003 Microbiología de alimentos para consumo humano y animal- Protocolo para la validación de métodos alternativos.
- ISO TS 19036:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.
- ISO TS 11133-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Guidelines on preparation and production of culture media -- Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory
- NT-32 Rev. 3 Abril 2012, Análisis microbiológico: Documento aclaratorio.
- ISO IEC 17025:2005 Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración
- ISO 3534-1:2006 Statistics -- Vocabulary and symbols -- Part 1: General statistical terms and terms used in probability.
- ISO 5725-1:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 1: General principles and definitions

**6. Definiciones**

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

**Cepa microbiológica:** El aislamiento de cualquier organismo microbiológico que está genotípicamente, fenotípicamente y bioquímicamente tipificado.

**Especificidad:** (para un tipo de matriz y un nivel de inoculación dado) Fracción del número total de cultivos o colonias negativos que son asignados correctamente con el método utilizado.

Nota: También puede definirse como la capacidad de un método de no detectar el microorganismo objetivo, si este no está presente.

**SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD**  
**PO 9.4 POLÍTICA PARA LA VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**  
**DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**  
**VERSIÓN 1            REVISIÓN 0**  
**APROBADO 12/11/14**

---

**Factor de cobertura (k):** factor numérico utilizado como multiplicador de la incertidumbre de medida para obtener una incertidumbre expandida de medición.  
Nota: Típicamente su valor se encuentra entre 2 y 3.

**Incetidumbre de medida:** Parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando. Nota: El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación estándar (o un múltiplo de ella), o la mitad de un intervalo de un nivel de confianza determinado.

**Incetidumbre combinada,  $u_c$  (y):** incertidumbre estándar de un resultado,  $y$ , de una medición cuando ese resultado es obtenido a partir de valores de otras cantidades, que es igual a la raíz cuadrada positiva de la suma de los términos, siendo estos términos, las varianzas o covarianzas de esas cantidades divididas por los resultados de esas mediciones.

**Incetidumbre estándar,  $u$  (xi):** incertidumbre del resultado  $x_i$  de una medición expresada como una desviación estándar.

**Incetidumbre expandida (U):** cantidad que define a un intervalo en torno al resultado de una medición que puede esperarse que incluya una fracción grande de la distribución de los valores que pueden atribuirse razonablemente al mensurando.

**Exclusividad:** es la capacidad de un método alternativo de detectar el microorganismo diana a partir de un amplio rango de cepas. Exclusividad es la falta de interferencia, en un método alternativo, a partir de un rango amplio de cepas no-diana.

Nota: La exclusividad expresa la capacidad del método de no detectar a los microorganismos no - diana, es decir aquellos que pueden presentar reacciones cruzadas con el microorganismo diana.

**Inclusividad:** es el rango de cepas que refleja la diversidad genética y / o serológica del microorganismo diana que el método puede detectar. La inclusividad y la exclusividad se determinan sobre un amplio rango de cultivos puros de cepas diana y no - diana, mientras que la sensibilidad/especificidad se determinan en matrices contaminadas. La inclusividad/exclusividad da una medida de la selectividad del método. Este requisito no es aplicable al recuento total de microorganismos viables, recuento de hongos y levaduras o métodos de enumeración que no están dirigidos contra microorganismos específicos.

**Límite de detección:** aplicado a ensayos microbiológicos cualitativos, es el número mínimo de microorganismos que pueden ser detectados, pero en cantidades que no pueden estimarse con precisión.

**Límite de cuantificación:** aplicado a ensayos microbiológicos cuantitativos, es el número mínimo de microorganismos dentro de una variabilidad definida que puede determinarse en las condiciones experimentales del método evaluado.

Nota: También se le denomina límite de determinación. Representa el nivel más bajo validado con una precisión satisfactoria.

**Mensurando:** magnitud que se desea medir.

**SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD**  
**PO 9.4 POLÍTICA PARA LA VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**  
**DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**  
**VERSIÓN 1            REVISIÓN 0**  
**APROBADO 12/11/14**

---

Nota: En microbiología el mensurando es definido en términos del método empleado. Puede expresarse, por ejemplo, como UFC por la unidad de cantidad de muestra (UFC/mL ó UFC/g).

**Método cualitativo:** método de análisis cuya respuesta es la presencia o ausencia del analito, detectado de forma directa o indirecta en una cierta cantidad de muestra.

**Método cuantitativo:** método de análisis cuya respuesta es la cantidad del analito medido de forma directa (enumeración en masa o volumen), o indirecta (color, absorbancia, impedancia, etc.) en una cierta cantidad de muestra.

**Método de referencia:** método internacionalmente reconocido y ampliamente aceptado.

Nota: (por ejemplo, NMKL, ISO, CEN, métodos de AOAC Internacional, métodos que se indican en la Unión Europea, en las legislaciones nacionales y ciertas normas nacionales de calidad equivalente).

**Método alternativo:** método de análisis que demuestra o estima, para una dada categoría de productos, el mismo analito que se mide utilizando el correspondiente método de referencia.

**Precisión de medida:** proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas.

Nota: Es habitual que la precisión de una medida se exprese numéricamente mediante medidas de dispersión tales como la desviación típica, la varianza o el coeficiente de variación bajo las condiciones especificadas. Las "condiciones especificadas" pueden ser condiciones de repetibilidad, condiciones de precisión intermedia, o condiciones de reproducibilidad

**Precisión intermedia:** precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de precisión intermedia.

Nota: Este conjunto de condiciones incluye el mismo procedimiento de medición, el mismo lugar y mediciones repetidas del mismo objeto u objetos similares durante un periodo amplio de tiempo, pero que puede incluir otras condiciones que involucren variaciones. Las variaciones pueden comprender nuevas calibraciones, patrones, operadores y sistemas de medida. En la práctica, conviene que toda especificación relativa a las condiciones incluya las condiciones que involucren variaciones y las que no.

**Rango de validación:** rango de número medio de partículas por porción analítica para el cual las expectativas de las especificaciones de validación (en particular linealidad) han sido aceptablemente demostradas. Nota: por lo general se expresa como el rango de recuento de colonias "confiable".

**Repetibilidad:** precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad.

Nota: Este conjunto de condiciones incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodo corto de tiempo.

**Reproducibilidad:** precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad.

Nota: Este conjunto de condiciones incluye diferentes lugares, operadores, sistemas de medida y mediciones repetidas de los mismos objetos u objetos similares. Los diferentes sistemas de medición pueden utilizar diferentes procedimientos de medida. En la práctica, conviene que toda especificación relativa a las condiciones incluya las condiciones que varían y las que no.

**SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD**  
**PO 9.4 POLÍTICA PARA LA VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**  
**DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**  
**VERSIÓN 1            REVISIÓN 0**  
**APROBADO 12/11/14**

---

**Robustez:** capacidad de un método para mantenerse sin cambios ante pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, que provee una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

Nota; las variaciones a las que hace referencia la definición son por ejemplo, cambios en las condiciones ambientales, en las condiciones de incubación (tiempo/temperatura), calidad y vida útil de medios de cultivo y reactivos, pH, etc. La información de la prueba de robustez puede utilizarse para especificar las condiciones en que debe ser aplicado el método

**Sensibilidad** (para un tipo de matriz y un nivel de inoculación dado): Fracción del número total de cultivos o colonias positivos que son correctamente asignados con el método utilizado. También puede definirse como la capacidad de un método de detectar el microorganismo diana, cuando este está presente.

**Tasa de Falsos Positivos** (para un tipo de matriz y un nivel de inoculación dado): es la probabilidad o frecuencia con que la muestra sea asignada como positiva cuando en realidad es negativa. Falsos Positivos son aquellos que han sido asignados como tales conociendo que en realidad son negativos. La incidencia de falsos positivos es igual a: 1 menos la especificidad.

**Tasa de Falsos Negativos** (para un tipo de matriz y un nivel de inoculación dado): es la probabilidad o frecuencia con que una muestra conocida como positiva, sea asignada como negativa por el método. La incidencia de falsos negativos es igual a 1 menos la sensibilidad.

**Validación:** Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.

**Verificación:** Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados.

**Veracidad:** proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia.

Nota: El verdadero valor de una cantidad es un concepto teórico y, en general, no puede ser conocido exactamente. En la práctica el valor de referencia aceptado puede sustituir al valor verdadero. La veracidad se expresa habitualmente en términos de sesgo o bias. Es aceptado, en los ensayos microbiológicos cuantitativos, que no se tenga en cuenta al sesgo, en la estimación de la incertidumbre de medición debido a la naturaleza empírica de los métodos microbiológicos. Es el procedimiento analítico el que determina directamente el resultado de la medición, por ejemplo, el número de unidades formadoras de colonias por unidad de muestra. Por lo tanto, no es posible en la práctica determinar el valor verdadero que se requiere para determinar el sesgo. Incluso cuando se utilicen materiales de referencia certificados, o los valores derivados de los Ensayos de Aptitud, sólo puede evaluarse una parte del sesgo. En cualquier caso, aun cuando no se evalúe el componente de la incertidumbre debida al sesgo, el laboratorio puede demostrar que se encuentra bajo control, por ejemplo, mediante su participación en ensayos de aptitud o mediante el ensayo de materiales de referencia certificados.

## **7. SIGLAS**

ISO: Organización Internacional de Normalización

**SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD**  
**PO 9.4 POLÍTICA PARA LA VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**  
**DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**  
**VERSIÓN 1 REVISIÓN 0**  
**APROBADO 12/11/14**

NMKL: Instituto Noruego Veterinario  
 UNE EN: Norma Técnica Europea  
 AOAC: Asociación Oficial de Químicos Analistas  
 APHA: Asociación Americana de Salud Pública  
 USP: Farmacopea de los Estados Unidos

**8. Procedimiento**

Cada método de análisis debe evaluarse de acuerdo al diseño presentado en el protocolo de validación y demostrar que es adecuado para la o las matrices de interés.

Análisis de alimentos: Dada la cantidad de matrices en las que los métodos pueden aplicarse se establece que los laboratorios deben demostrar competencia en los tipos o grupos de alimentos objeto del alcance de la acreditación.

El laboratorio deberá demostrar la validación correspondiente por tipo de alimento en al menos 2 matrices. Ejemplo: Para contar con la acreditación de un determinado ensayo en Cárnicos crudos, el laboratorio deberá demostrar la validación en al menos 2 alimentos (carne de cerdo, carne de res, etc.).

Cada vez que el laboratorio desee ampliar el ensayo en otro tipo de alimento, este deberá aplicar la validación correspondiente.

Grupos de alimentos	Cárnicos	Aves	Productos de la pesca	Frutas y vegetales	Productos lácteos	Chocolate y productos de panadería	Misceláneos	Alimentos para animales
Tipo de alimentos	Crudos	Procesados por calor	Crudos	Crudos	Crudos	Bajos en humedad	Cerveza	Misceláneos
	procesados	congelados	Procesados	Procesados	Procesados	Secos	Aderezos	
	congelados	Materia prima	congelados	Congelados	Congelados	otros	Mayonesa	
	Curados	otros	Curados	Curados/salados	Otros		Huevos y misceláneos	
	Fermentados		Otros	Secos	Secos		Pasta	
	Otros			Jugos y concentrados			Cereales/Arroz	
				De baja humedad			Especies	

Análisis de agua: El laboratorio debe demostrar competencia en la realización del análisis en la matriz de interés de acuerdo a la clasificación y los valores permisibles que se señalan en las normas y reglamentos técnicos vigentes de acuerdo al tipo de agua. Para aquellas matrices de las que no se dispone de una norma deben justificarse los criterios de validación en función al uso propuesto. Deben revisarse los lineamientos para la validación y el control de calidad de los ensayos que están contenidos en las referencias de los mismos.

**SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD**  
**PO 9.4 POLÍTICA PARA LA VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**  
**DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**  
**VERSIÓN 1            REVISIÓN 0**  
**APROBADO 12/11/14**

Análisis de medicamentos y materias primas: Prevalcen los lineamientos proporcionados para la validación de acuerdo a la referencia del ensayo (USP, BP, FEUM, entre otros). Debe en todo caso demostrarse la competencia, según lo definido en la referencia, para realizar el análisis a forma de asegurar el resultado de acuerdo a la especificación farmacopeica.

### **8.1    Definición sobre método de ensayo**

La norma ISO IEC ISO/IEC 17025 en su apartado 5.4.2 establece que *“El laboratorio debe utilizar métodos de ensayo que satisfagan las necesidades del cliente y sean apropiados para el uso previsto”*. Por tanto, debe tenerse en cuenta el ámbito de aplicación, tanto por el laboratorio en cuanto a la selección de los procedimientos de ensayo y su validación.

La norma establece que *“cuando el cliente no especifique el método a utilizar, el laboratorio debe seleccionar los métodos apropiados que hayan sido publicados en normas internacionales, regionales o nacionales, por organizaciones técnicas reconocidas o en libros o revistas científicas especializados o especificados por el fabricante de equipos”*. Por tanto, en el caso de elegir un procedimiento de ensayo interno, es recomendable que se parta de métodos de referencia que sean ampliamente aceptados, conocidos y aplicados en el sector.

Así pues, debido al marco en que se ubica la aplicación y uso de los ensayos microbiológicos, se podría establecer la siguiente clasificación de métodos, atendiendo al nivel de confianza que aportan y que, por tanto, marcarán el nivel de información adicional que OSA requerirá relativa a su validez:

**Tipo I: Métodos normalizados.** Son métodos desarrollados por un organismo de normalización o por otras organizaciones bien establecidas, cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico en cuestión (ILAC G 18) (Ej.: ISO, NMKL, UNE EN, AOAC, APHA, USP, entre otros)“.

Nota: Un método normalizado ha sido exhaustivamente estudiado y describe de forma clara y exacta las condiciones de realización del ensayo. Sus características de funcionamiento deben ser acordes con el uso previsto. Estos métodos normalizados son considerados métodos de referencia ya que pueden ser utilizados para evaluar otros métodos desarrollados para la misma determinación (ISO 16140).

**Tipo II: Métodos alternativos.** 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 son generalmente reconocidos por la comunidad científica y tecnológica como equivalentes al método de referencia.

**Tipo III: Métodos basados en métodos de referencia.** Métodos descritos en procedimientos internos del laboratorio, que están basados claramente en métodos de referencia y que no suponen una modificación técnica respecto del método de referencia que ponga en cuestión su validez técnica.

Deben mantenerse actualizados en relación con el método de referencia en que se fundamentan.

Nota: En cualquier caso, se consideran modificaciones técnicas respecto del método de referencia, aquellas que pongan en cuestión su validez técnica, como por ejemplo, cambios relevantes en un medio de cultivo, cambios en las condiciones de incubación (tiempo/temperatura), etc.



**Tipo IV: Otros métodos.** Son aquellos métodos desarrollados por el propio laboratorio o por cualquier otra parte (un fabricante o proveedor de equipos, de medios de cultivo etc.), y que no disponen del reconocimiento de los métodos de referencia o de los métodos alternativos.

Como parte de los procedimientos de ensayo, se deben incluir también los procedimientos para la preparación de las muestras en relación con el alcance solicitado, pues se trata de un aspecto crítico en determinados alcances (ej.: alimentos). Existen normas reconocidas que regulan la manipulación previa de los objetos de ensayo (ej. serie de normas ISO 6887, UNE-EN ISO 8261) y que deben ser consideradas como una referencia adecuada.

## **8.2 Características de funcionamiento de los métodos. Validación.**

Los métodos de ensayo presentados para su acreditación deben estar validados. Para ello, es necesario conocer las características de funcionamiento del método. Por otra parte, la extensión de las actividades de validación a realizar por el laboratorio dependerá del tipo de método seleccionado:

### **8.2.1 Métodos Normalizados (Tipo I)**

Los métodos normalizados entendidos como de referencia no requieren una validación completa. El laboratorio debe, tal y como establece la norma ISO/IEC 17025:2005 "confirmar que puede aplicar correctamente los métodos normalizados antes de utilizarlos para los ensayos".

### **8.2.2 Métodos alternativos (Tipo II).**

A efectos de validación, los **métodos alternativos** se tratarán como los métodos de referencia. No obstante, para que OSA entienda que un método se puede considerar como **método alternativo** deberá disponer de evidencias de su validación. En caso de que dichas evidencias no estén disponibles será responsabilidad del laboratorio solicitante el aportarlas.

### **8.2.3 Métodos basados en métodos de referencia (Tipo III).**

Los métodos basados en métodos de referencia no precisan de una validación completa. No obstante el Laboratorio deberá realizar la necesaria comprobación de su funcionamiento.

## **Comprobación de la Aplicación correcta de métodos Tipo I, II y III**

El laboratorio debe justificar la selección del número y tipo de matrices en función del alcance de acreditación y ésta debería basarse en la información tomada de referencias bibliográficas o estándares internacionales (ej.: Anexo B de ISO 16140, ISO/TS 19036).

### 8.2.4 Otros métodos (Tipo IV)

La norma ISO/IEC 17025 en su apartado 5.4.2 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 en los apartados 7.3.1, 7.3.2 y 7.3.3 de este documento, se han considerado como válidas para asegurar la adecuación al uso, pero no permiten garantizar de forma completa la validez de los métodos definidos como Tipo IV ni su caracterización ya que éstas deben estar fundamentadas en referencias válidas (ej.: ISO 16140, ISO /TR 13843, UNE-EN ISO 1799). Por lo tanto el Laboratorio deberá disponer de evidencias completas de que los métodos han sido validados de forma adecuada.

### 8.3 Procedimiento de validación

Se presentan a continuación características de funcionamiento que al menos se deben confirmar en el caso de métodos de referencia, alternativos y basados en métodos de referencia teniendo en cuenta la naturaleza del método:

#### 8.3.1 Métodos Cuantitativos

Tener en cuenta que para cada uno de los parámetros acá definidos y sus respectivas especificaciones, prevalece lo establecido en los métodos de referencia utilizados para cada uno de los métodos.

Parámetro		
Repetibilidad	<b>Muestras no contaminadas</b>	<b>Muestras contaminadas naturalmente</b>
	Analista: uno Número mínimo de ensayos: seis Nivel de fortificación: al menos uno de acuerdo a la especificación del método. Límite de repetibilidad $r < 3\%$  $r = 2.8 * \sqrt{\frac{z DSR^2}{n}}$  $r\% = r * 100$	Analista: uno Número mínimo de ensayos: seis Nivel de fortificación: no aplica. $r < 3\%$

**SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD**  
**PO 9.4 POLÍTICA PARA LA VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**  
**DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**  
**VERSIÓN 1 REVISIÓN 0**  
**APROBADO 12/11/14**

	$DSR = \frac{S}{\bar{X}}$	
<b>Reproducibilidad</b>	<p>Número de repeticiones: no menos de seis por analista.  Mínimo 2 analistas.  Nivel de fortificación: al menos uno de acuerdo a la especificación.  <math>R &lt; 3\%</math></p> $R = 2.8 * \sqrt{\frac{DSR_1^2 + DSR_2^2}{n}}$ <p><math>R\% = R * 100</math></p>	<p>Numero de repeticiones: no menos de seis por analista.  Nivel de fortificación: no aplica  <math>R &lt; 3\%</math></p>
<b>Recuperación</b>	<p>Número de repeticiones: al menos 6 porciones de muestra por cada analista.  Tipo de muestras: solo muestras no contaminadas.  El nivel de fortificación al menos uno y se espera una recuperación entre el 90-110 % log.  La verificación del inoculo puede realizarse durante la ejecución del ensayo por sextuplicado.  Nota/ en algunos casos puede requerirse más de un nivel de fortificación de acuerdo al rango de trabajo del método.</p> $\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{Media del logaritmo del recuento} * 100}{\text{Logaritmo de las UFC inoculadas}}$	
<b>Sesgo</b>	<p>Numero de repeticiones: por lo menos 6  Tipo de muestras: solo muestras no contaminadas.  Número de analistas: uno  Nivel de fortificación: por lo menos uno (medio)  Cálculo:  La diferencia absoluta de lo recuperado y lo inoculado es <math>&lt; 0.3 \text{ log}</math></p>	
<b>Incetidumbre</b>	<p>Se considera una referencia adecuada las pautas establecidas en el documento técnico ISO/TS 19036:2006.</p> $s_R = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}}$ <p>Donde  <math>y_{ij}</math> :son los datos transformados a logaritmo, en <math>\log_{10} (\text{ufc} / \text{g})</math> o <math>\log_{10} (\text{ufc} / \text{ml})</math>;  <math>i</math> :es el índice de la muestra, <math>i = 1 \text{ a } n</math> (<math>n &gt; 10</math>);  <math>j</math> :es el índice de la condición de reproducibilidad, <math>j = A \text{ o } B</math>.</p>	

**SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD**  
**PO 9.4 POLÍTICA PARA LA VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**  
**DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**  
**VERSIÓN 1 REVISIÓN 0**  
**APROBADO 12/11/14**

**Nota: El uso de otro criterio o especificación debe ser justificado**

**8.3.2 Consideraciones en la técnica del NMP.**

La técnica del NMP se fundamenta en la detección de una reacción positiva ya sea turbidez, fluorescencia o gas por lo que en un principio se debe evaluar la capacidad del medio para producir la reacción tal como en los métodos cualitativos. La interpretación numérica se hace bajo la probabilidad de detectar al menos una célula viable para producir la reacción positiva en la dilución de la muestra. El número más probable corresponde a la combinación de los resultados positivos encontrada en la tabla en la que cada factor se acompaña de límites de probabilidad estadística a 95 % de confianza. Por su naturaleza no puede evaluarse enteramente como método cuantitativo aunque sí debe determinarse su exactitud y precisión.

<b>Repetibilidad</b>	<b>Muestras no contaminadas</b>	<b>Muestras contaminadas naturalmente</b>
	Analista: uno Número mínimo de ensayos: cinco Nivel de fortificación: al menos uno de acuerdo a la especificación del método $r < 32\%$ Calcule la repetibilidad como la desviación estándar de los replicados en cada concentración y para cada matriz.  $r\% = CV\% * 2.8$  $CV\% = \frac{S}{\bar{X}} * 100$  $\bar{X} = \frac{\sum Log}{n}$	Analista: uno Número mínimo de ensayos: cinco. Nivel de fortificación: no aplica. $r < 32\%$
<b>Reproducibilidad</b>	Numero de repeticiones: por lo menos 5 por analista Numero de analistas: por lo menos 2 Nivel de fortificación: al menos 1 $R < 32\%$  $R\% = CV\% \text{ de Promedios} * 2.8$  $CV\% = \frac{S}{\bar{X}} * 100$	Numero de repeticiones: por lo menos 5 por analista Numero de analistas: por lo menos 2 Nivel de fortificación: no aplica $R < 32\%$

**SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD**  
**PO 9.4 POLÍTICA PARA LA VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**  
**DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**  
**VERSIÓN 1 REVISIÓN 0**  
**APROBADO 12/11/14**

	$\bar{X} = \frac{\sum \text{Log promedio de analistas}}{n}$	
<b>Exactitud</b>	El límite de confianza del resultado obtenido en la tabla del NMP describe que el 95 % de las muestras caen en ese intervalo por lo que la combinación encontrada para el control positivo se toma como referencia para determinar el intervalo de confianza. El 95 % de todos los resultados de las muestras deberán encontrarse en ese intervalo.	
<b>INCERTIDUMBRE</b>	No es de aplicación	

### 8.3.3 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 a estos niveles.

<b>Parámetros</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
Verificación del tamaño del inóculo	Al verificar el tamaño del inóculo por lo menos seis veces, en promedio se obtienen cuentas de menos de 10 UFC* y ninguna de 10 UFC o mas.
Verificación de la muestra.	Numero de repeticiones: 3 Analistas: uno Resultados positivos: 0%
Verificación del límite de detección.	Numero de repeticiones: al menos 6 por analista Analistas: al menos dos Resultados positivos: al menos el 80 % Tamaño del inóculo: menos de 10 UFC
Falsos positivos	Numero de repeticiones: al menos 6 por analista Analistas: al menos dos Resultados positivos verdaderos: 100 % Falso positivo: 0 Tamaño del inóculo: más de 100 UFC
Incetidumbre	No es de aplicación a métodos cualitativos

\* Preferentemente menores o iguales a 5 UFC

#### **8.4    Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo**

En la norma ISO IEC 17025: 2005 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:

##### **8.4.1    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 parámetro de 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. 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.

##### **8.4.2    Control Externo (Intecomparaciones)**

La participación en intercomparaciones se debe realizar de acuerdo a lo definido en la política del OSA PO 11.1 política de ensayos de aptitud

## **9.    Vigencia**

**SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD**  
**PO 9.4 POLÍTICA PARA LA VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**  
**DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**  
**VERSIÓN 1            REVISIÓN 0**  
**APROBADO 12/11/14**

---

Los laboratorios acreditados, en proceso y nuevos solicitantes deberán analizar, comprender e implementar las disposiciones de esta política antes del **01 de julio del 2015**, para lo cual deberá de cumplir con las siguientes disposiciones:

- a) Los laboratorios acreditados o en proceso de acreditación deberán elaborar un plan de transición para el cumplimiento de esta política el cual deberá ser enviado al OSA a más tardar el día **20 de febrero de 2015**.
- b) La verificación del cumplimiento de este plan de transición se llevara a cabo según las siguientes disposiciones:
  - 1. Para laboratorios acreditados cuya evaluación de vigilancia o renovación está programada para el primer semestre del 2015, la verificación del cumplimiento de esta política se realizara durante la evaluación correspondiente. Si durante la evaluación se encontrara incumplimiento con las disposiciones establecidas el hallazgo se incluirá en el informe como una observación, la cual deberá ser solventada antes del 01 de julio de 2015.
  - 2. Para los laboratorios acreditados cuya evaluación de vigilancia o renovación está programada para el segundo semestre del 2015, la verificación del cumplimiento de esta política será verificada durante la evaluación correspondiente, cualquier incumplimiento de estas disposiciones serán incluidas en el informe de hallazgo como una No Conformidad la cual sebera ser superada en el plazo establecido según el procedimiento de acreditación.
  - 3. Los laboratorios que soliciten una acreditación inicial al OSA a partir de enero 2015, deberá cumplir con las disposiciones establecidas en esta política
- c) Si la verificación del cumplimiento del plan de transición a la Política para la Validación y estimación de la incertidumbre de métodos microbiológicos, o acciones establecidas en el plan de acción producto de las evaluaciones de vigilancia o renovación, correspondientes al cumplimiento de esta política, se llevara a cabo como una actividad independiente de la evaluación de cierre o verificación de acciones producto de las evaluaciones de vigilancia o renovación, el laboratorio deberá de cancelar la tarifa correspondiente a la verificación de cierre de acciones.

**Anexo 1**

**Contenido del protocolo de validación de métodos microbiológicos.**

1. **Objetivo:** Fin que se pretende con la realización de las actividades
2. **Alcance:** delimitación de las actividades en cuanto al tipo de muestra, definición del método y su referencia, especificación. Se define el tiempo para realizar las actividades planificadas.
3. **Responsables:** se definen los analistas, encargados de revisar los datos y autorizar el informe.
4. **Criterios de aceptación de los parámetros de mérito**
5. **Parámetros en estudio:** se especifica sobre cada una de las pruebas a realizar y los criterios. Se incluye aquí la incertidumbre si es que aplica.
6. **Equipos y materiales:** Definir los insumos, equipo, reactivos, materiales de referencia y cualquier otro elemento a usa en las actividades
7. **Procedimiento:** Detallar el procedimiento para cada una de las pruebas
8. **Algoritmos:** Definir algoritmos de cálculo e incluir plantillas (si es que van a usarse)
9. **Evidencia de la revisión y aprobación del protocolo de actividades**

## **ANEXO 2**

### **Contenido del informe de validación de métodos microbiológicos**

1. **Objetivo:** Fin que se pretende con la realización de las actividades



2. **Alcance:** delimitación de las actividades en cuanto al tipo de muestra, definición del método y su referencia, especificación. Se define el tiempo para realizar las actividades planificadas.
3. **Responsables:** se definen los analistas, encargados de revisar los datos y autorizar el informe.
4. **Equipos y materiales:** Definir los insumos, equipo, reactivos, materiales de referencia y cualquier otro elemento a usa en las actividades
5. **Detalle de los resultados por prueba de acuerdo a lo planteado en el protocolo**
6. **Cálculos y otros datos**
7. **Conclusiones:** conclusiones por parámetro de estudio y una declaración sobre el resultado de la aptitud
8. **Evidencia de la revisión y aprobación del informe de validación.**