

	CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLOGÍA	
	Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá	
	Código: D-7.7-01	Versión: 10
	Revisó: Subdirector de Planeación y O.T.	Aprobó: Director General (E).
	Fecha: 09 de Julio de 2025	Fecha: 09 de Julio de 2025
	Resolución: 100-03-10-23-1338-2025	Páginas: 1 de 41

1. OBJETIVO

Garantizar el cumplimiento requerido para la realización de análisis microbiológicos teniendo en cuenta todas las variables que influyan en el proceso y de la misma manera identificar necesidades de mejora en las operaciones, garantizar la trazabilidad y asegurar su cumplimiento

2. ALCANCE

El control de calidad de microbiología D-7.7-01 aplica para las actividades, procesos y metodologías que se llevan a cabo en el área.

3. CRITERIOS DE BIOSEGURIDAD

La bioseguridad tiene como principal objetivo la protección del personal no solo relacionado con el área de microbiología sino, todo personal que pueda estar potencialmente expuesto.

El área de microbiología del laboratorio de CORPOURABA de acuerdo a la combinación de las prácticas y técnicas de laboratorio, equipos de seguridad e instalaciones del laboratorio, se clasifica como nivel 2 de bioseguridad, por lo tanto, se emplean los siguientes protocolos de bioseguridad:

- El personal a cargo del área de microbiología cuenta con entrenamiento específico en el manejo de agentes patógenos.
- El acceso al área de microbiología es limitado cuando se están procesando muestras o llevando a cabo técnicas.
- Se toma extrema precaución con los elementos cortopunzantes que estén contaminados con microorganismos, elementos como pipetas, jeringas, cubreobjetos y portaobjetos, tubos, entre otros.
- Cabinas de flujo laminar son usadas como equipo de protección durante el procesamiento de muestras y manipulación de microorganismos infecciosos que puedan generar aerosoles e infecciones.
- Después de realizar análisis y antes de salir del laboratorio el personal debe hacer un adecuado lavado de manos.
- No está permitido, comer, tomar, fumar, usar lentes de contacto, aplicar cosméticos ni guardar alimentos en el área de microbiología.

- Se prohíbe pipetear con la boca.
- Descontaminar las superficies y áreas de trabajo al empezar y al término de la jornada laboral, y después de cualquier derrame o chapoteo de material viable y potencialmente contaminado, para descontaminar, emplear sustancias desinfectantes que sean efectivas con el agente microbiano que se esté trabajando.
- Todo material contaminado, desechable o no desechable, es inactivado apropiadamente por medio calor al vapor.
- Se realiza periódicamente un programa efectivo de control de roedores e insectos.
- Los residuos potencialmente infecciosos son dispuestos en guardianes o contenedores especiales debidamente marcados y debidamente cerrados, con el fin de evitar fugas durante su recolección, manipulación, procesamiento, almacenamiento, transporte o envío.
- Durante el procesamiento de muestras y el cultivo de microorganismos se emplean tapabocas con el fin de evitar aspirar aerosoles generados por microorganismos infecciosos. De igual forma la manipulación de cepas microbiológicas es desarrollada siempre en la cabina de bioseguridad.
- Elementos de protección personal como: gorros, guantes, batas y gafas de seguridad son utilizados como elementos de protección en el laboratorio.
- Se usan guantes cuando es manipulado material potencialmente infeccioso, superficies contaminadas o equipos.

4. INSTALACIONES

El área de microbiología del laboratorio de aguas de CORPOURABA cuenta con las siguientes condiciones ambientales que permiten asegurar la calidad de los análisis efectuados en esta:

4.1 Control de Temperatura y Humedad Relativa

El control de estos parámetros se realiza según lo establecido en el procedimiento “P-6.3-03: CONTROL DE CONDICIONES AMBIENTALES”.

Al inicio de cada jornada, se enciende el aire acondicionado del área de microbiología, asegurándose que el flujo de este no haga contacto directo con ninguna de las áreas de siembra, esto con el fin de evitar contaminaciones; se revisa que las puertas se encuentren debidamente cerradas para evitar el intercambio de ambiente y garantizar una temperatura constante.

La temperatura y humedad relativa del área de trabajo se encuentra en un rango de (**Temperatura** de 16-27°C y **Humedad relativa** de 30-80 %); la cual es la temperatura requerida para las instalaciones donde se encuentren los equipos e incubación de microbiología, esta actividad se realiza en horas de la mañana y tarde con un espacio entre las lecturas no menor de 4 horas. La actividad se registra en el formato “R-6.3-01: CONTROL DE CONDICIONES AMBIENTALES”.

En caso de que los rangos de temperatura y humedad relativa no se obtengan, se suspenden las actividades y se toman los correctivos necesarios de acuerdo con lo establecido en el procedimiento “P-MJ-08: ACCIONES PARA EL MEJORAMIENTO”.

4.2 Espacio de Trabajo

En el área de siembra de microbiología se lleva registro de las condiciones ambientales las cuales son tomadas en horas de la mañana y de la tarde. Los rangos de temperatura y humedad relativa de esta área se establecerán con base en los registros de los primeros 30 datos que se arrojen; como medida de aseguramiento de calidad, se llevará un control microbiológico de ambiente por exposición durante el proceso de siembra se incubará por 48 horas 35+/- 0.5 °C, el crecimiento no debe ser mayor a 15 UFC, si ocurre un crecimiento mayor, se realizará un trabajo no conforme y se rechazarán los resultado de ese lote de trabajo, donde el laboratorio debe asumir la información al usuario y la respectiva toma de nueva muestra y respectivo proceso de siembra. Los resultados de este control se registran en las observaciones del R-7.7-03 V 04 CONTROL DE CABINA DE FLUJO LAMINAR HORIZONTAL.

Con el fin de evitar contaminación cruzada, las muestras de agua potable son procesadas en horarios diferentes a las muestras de agua cruda; llevando a cabo un proceso de desinfección y esterilización por radiación UV entre los procesos. El área de siembra cuenta con una cabina de flujo laminar para garantizar que el ambiente de siembra sea estéril.

Las muestras microbiológicas que ingresan al laboratorio, son preservadas en la Nevera de Muestras Microbiológicas y separadas internamente por estantes; en la parte superior se almacenan únicamente muestras de agua potable, en el estante de las medias muestras de agua potable procesadas, en la parte inferior muestras crudas y muestras de agua cruda procesadas.

Se cuenta con una nevera para los medios de cultivo y material de trabajo y reactivos que necesiten condiciones de refrigeración. En la parte superior del refrigerador están los medios de cultivo sólidos en cajas de Petri, en la siguiente bandeja están los medios líquidos y en la puerta los reactivos y materiales de trabajo.

4.3 Limpieza y Desinfección del Área de Trabajo

Las superficies de trabajo del área de microbiología son desinfectadas al inicio y al final de la jornada laboral, siempre que se analicen muestras de agua o que se realicen siembras de cepas.

4.3.1 Preparación de desinfectantes

Para la preparación de los agentes desinfectantes a las concentraciones deseadas se emplea la siguiente fórmula:

$$V_1C_1=V_2C_2$$

Dónde:

$$V_2 \times C_2 / C_1$$

V₁: Volumen deseado
C₁: Concentración conocida
V₂: Volumen conocido
C₂: Concentración deseada

4.3.2 Soluciones Desinfectantes

Hipoclorito de Sodio: mesas de trabajo 500 mg/L; pisos 200 mg/L, áreas contaminadas 500 mg/L.

Alcohol Etanol: al 70% para limpieza de mesones, paredes y superficies en general exceptuando pisos.

Ácido acético: al 2% para limpieza y desinfección de superficies y paredes exceptuando pisos.

Amonio cuaternario: la concentración a emplear varía de 1 a 2% para la limpieza y desinfección de superficies de laboratorio.

Detergente Neutro: para limpieza de áreas críticas como mesones y cabina de flujo laminar se usa detergente a 1%; y de material de vidrio 10 ml de detergente por cada 1000 mL de agua.

4.3.3 Limpieza y Desinfección de Pisos y Paredes:

Las actividades de limpieza se realizan de la siguiente manera:

- Recoge y desecha los residuos del producto, polvo o cualquier otra suciedad presente en el lugar a limpiar.

- Humedece con suficiente agua potable el lugar o superficie que se va a limpiar.
- Prepara la solución de detergente en polvo (comercial).
- Enjabona la superficie por limpiar, esparciendo la solución de detergente con esponja o cepillo.
- Recoge y desecha los residuos del producto, polvo o cualquier otra suciedad presente en el lugar a limpiar.
- Humedece con suficiente agua potable el lugar o superficie que se va a limpiar.
- Prepara la solución de detergente (comercial).
- Enjabona la superficie por limpiar, esparciendo la solución de detergente con esponja o cepillo.
- Restriega la superficie fuertemente con ayuda de un paño o cepillo, eliminando toda la suciedad posible.
- Dejar la solución de detergente aplicada por espacio de cinco minutos.
- Enjuagar con suficiente agua asegurándose de que todo el detergente se elimine.
- Observar detenidamente el lugar que se limpió para verificar que haya sido eliminada toda suciedad.

Se registra la ejecución de la actividad en el formato “R-6.3-10: CONTROL DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN”. Las actividades de limpieza y desinfección de pisos se realizan diariamente, mientras que la limpieza y desinfección de paredes se realiza dos veces a la semana (al inicio y final de la misma).

4.3.4 Limpieza y Desinfección Mesones y Área de Siembra:

El (La) Responsable del Área y/o Auxiliar delegado, limpia y desinfecta las superficies de trabajo de microbiología diariamente (antes y después de las labores), de la siguiente manera:

- i. Recoge y desecha los residuos del producto, polvo o cualquier otra suciedad presente en el lugar a limpiar.
- ii. La solución desinfectante se deja sobre el lugar que se está desinfectando por un tiempo mínimo de un minuto, dependiendo de la sustancia utilizada.
- iii. Durante este tiempo, se está logrando eliminar la mayor cantidad posible de

microorganismos de modo que la superficie a limpiar queda bien desinfectada.

- iv. Se registra la ejecución de la actividad en el formato “R-6.3-10: CONTROL DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN”.

4.3.5 Limpieza de Equipos:

En el Área de Microbiología El (La) responsable y/o auxiliar delegado semanalmente aplica según el equipo los siguientes desinfectantes:

- **Incubadora:** después de realizar la debida limpieza interna de la incubadora con agua destilada, se procede a desinfectar con alcohol al 70% o ácido acético al 2% de 5-10 minutos, posterior a ello se limpia con agua destilada estéril. Intercambiando el desinfectante semanalmente.
- **Hornos:** La limpieza del horno se realiza utilizando un detergente mezclado con agua destilada con el fin de retirar residuos de derrames (agares, soluciones, etc.), dependiendo del grado de adhesión de la sustancia se usa un cepillo o brillo fino con el fin de garantizar su efectiva remoción. El proceso de desinfección se realiza usando sustancias como alcohol antiséptico al 70% o extrán neutro al 1% y se deja actuar durante 5-10 minutos, posterior a ello se limpia con agua destilada estéril.
- **Autoclaves:** La limpieza se realiza con agua destilada, detergente y brillo fino. Los cambios de agua destilada para esterilizar el material se realizan semanalmente.
- **Cabina de flujo laminar horizontal:** La limpieza y desinfección se realiza con agua destilada; ácido acético, detergente neutro o alcohol respectivamente (por 5 o 10 minutos).
- **Nevera:** La limpieza de la nevera se realiza con detergente, todas las partes removibles se retiran. Para el proceso de desinfección se usa detergente al 1% o hipoclorito de sodio 200mg/L de 5-10 minutos. El exceso de desinfectante es removido con agua destilada y las partes retiradas se reintegran al equipo.
- **Baño María:** La limpieza interna del baño maría se realiza con detergente y brillo fino, mientras que la parte externa se limpia con detergente, el proceso de desinfección se realiza con detergente neutro o alcohol antiséptico al 70% de 5 a 10 minutos. El exceso de desinfectante es removido con agua destilada. El agua destilada estéril usada en el baño maría es cambiada cada que se realice un ensayo por tubos u otra técnica que requiera del empleo de este equipo.

La limpieza y desinfección en el área de microbiología se registrará en el formato “R-6.3-10: CONTROL DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN”.

4.4 Control de Plagas:

Se realiza de acuerdo a lo establecido en el programa de mantenimiento de bienes y equipos - procedimiento “P-RI-01: COMPRAS E INFRAESTRUCTURA”.

4.5 Control Microbiológico de Ambientes:

4.5.1 Siembra por exposición

El (La) responsable del área de microbiología y/o Auxiliar de la misma, realiza control microbiológico de ambientes de la siguiente forma:

- i. Prepara cajas de petri con agar plate count (según indicaciones del fabricante impresas en el medio de cultivo).
- ii. Identifica los espacios dentro del área de microbiología en los cuales se llevará a cabo el control de ambiente (Incubadoras, Cabina de flujo laminar horizontal, Autoclaves, neveras), también se realiza control microbiológico de ambientes al cuarto de balanzas, debido a que en este espacio, se realiza el pesaje de los medios de cultivo y otros reactivos utilizados
- iii. Marca las cajas con agar plate count con el nombre del área, tiempo de exposición, hora y fecha.
- iv. Abre las cajas con agar y las expone durante 15 minutos.
- v. Tapa e incuba las cajas de agar plate count a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas para la determinación y cuantificación de microorganismos mesófilos.
- vi. Registra los resultados en el formato “R-6.3-11: CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES” y compara con resultados anteriores.

Los datos arrojados durante el control de ambientes serán expresados en UFC/min. En general la población de bacterias en el aire no debe exceder una concentración de una colonia por minuto; en caso de que se excedan estas concentraciones, el laboratorio analizará las poblaciones de microorganismos que se encuentran en el ambiente (identificación) y usará concentraciones más altas de desinfectantes, al igual que se modificarán los periodos de limpieza y desinfección (mayor periodicidad).

El control de ambientes por exposición se realizará mensualmente inmediatamente después de las actividades de limpieza y desinfección.

Para la cabina de flujo laminar, es importante que el número de microorganismos no supere las 5 UFC/15min.

4.5.2 Siembra por hisopada en superficie

El responsable del área de microbiología y/o auxiliar de la misma, realiza control microbiológico de superficies de la siguiente forma:

- i. Preparar hisopos estériles y retirar de la nevera cajas de petri con agar Plate Count para el recuento de aerobios mesófilos junto a tubos con 10 mL de agua peptona tamponada.
- ii. Identificar los espacios dentro del área de microbiología en los cuales se llevará a cabo el control microbiológico de superficies y marcar las cajas y tubos según corresponda.
- iii. Tomar un hisopo estéril y humedecerlo en agua peptona tamponada del tubo marcado con dicha superficie.
- iv. Con el hisopo inclinado, frota cuatro veces la superficie dentro de un área de 20 a 30 cm² aproximadamente cambiando la dirección en cada pasada y girando ligeramente el hisopo.

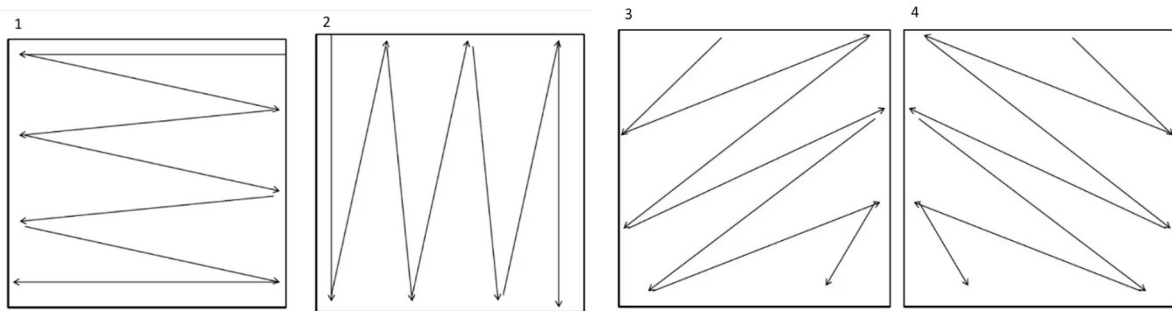


Figura 1: patrón de muestreo por hisopado para superficies regulares.

- v. Cortar el hisopo y depositarlo directamente en el tubo correspondiente con agua peptona tampona y mezcle suavemente. Esto lo realiza en todas las superficies.
- vi. Espere 20 minutos para que la muestra se mezcle bien e inocule 0,1 mL sobre la placa de agar y distribuya el inóculo empleando un extensor de vidrio.
- vii. Incuba las cajas inoculadas a 35°C durante 24-48 horas.
- viii. Determina las concentraciones de microorganismo por conteo de UFC/cm².

$$\frac{UFC}{cm^2} = \frac{(Número\ de\ colonias)(Factor\ de\ dilución)}{Superficie\ muestreada\ (cm^2)}$$

- ix. Registra los valores obtenidos, en el formato “R-6.3-11: CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES” y compara con resultados anteriores.

El control Microbiológico de ambientes por hisopada se realiza mensualmente, inmediatamente después de las labores de limpieza y desinfección. El valor máximo de microorganismos en el ambiente del laboratorio será determinado con el promedio de cinco valores consecutivos de los controles ambientales. En caso de haber cambios considerables en bacterias mesófilas obtenidos en el control microbiológico de ambientes, se llevarán a cabo actividades de control que involucren uso de desinfectantes a concentraciones más altas, cambio de desinfectantes o aumento en los tiempos de exposición a los mismos.

El control microbiológico por hisopadas, se realiza en: cabina de flujo laminar, autoclaves, incubadoras y las neveras. El control microbiológico por hisopada no se realiza en el cuarto de balanzas debido a que es un área compartida con fisicoquímica. No obstante, el personal del área de microbiología, realiza limpieza de mesones y de la balanza, previo al pesaje de medios de cultivo y reactivos.

4.6 Lavado y Esterilización de Vidriería y Recipientes Plásticos:

El auxiliar delegad@ y/o Personal de Servicios Generales cada vez que se utilice la vidriería y/o recipientes plásticos, hace el lavado respectivo de la siguiente manera:

- i. Sumersión de la vidriería y/o recipientes de uso general en una solución de agua y detergente neutro el material de uso general; para quitar los residuos biológicos y/o químicos por espacio mínimo de 2 horas. No utilizar jabón ni detergente alcalino.
- ii. Estregar la vidriería y/o recipientes con un churrusco.
- iii. Enjuague con abundante agua.
- iv. Para la vidriería y/o recipientes plásticos del área microbiológica se sumerge en una solución que contenga 5 mililitros de hipoclorito de sodio grado comercial por cada litro de agua.
- v. Enjuague con abundante agua destilada.
- vi. Secado de la vidriería.
- vii. La vidriería utilizada en el área microbiológica se seca al calor a 150° C. No someter nunca el material de vidrio a cambios bruscos de temperatura, por lo tanto no retirarlos calientes del horno de secado ni colocarlos calientes sobre una superficie fría o húmeda.

4.7 Control de Lavado :

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá		
D-7.7-01	Versión: 10	Página: 9 de 41

Para el control del lavado del área de microbiología, es importante, tener especial control en los recipientes de toma de muestra, debido a que la presencia de detergente, puede arrojar análisis de falsos negativos o disminuir la carga microbiana de las muestras.

El responsable del área y/o su delegado (a), controla el lavado por lote, utilizando azul de bromotimol:

- Verifique que la solución sea neutra antes de usarla por primera vez con un medidor de pH.
- Añada unas gotas de indicador de azul de bromotimol para detectar residuos alcalinos o ácidos a una pieza representativa de cada tipo de material de vidrio o plástico limpio y seco de cada lote preparado.
- El indicador es verde cuando es neutro, azul cuando es alcalino y amarillo cuando es ácido. El indicador es verde cuando el material de vidrio se ha lavado y enjuagado correctamente.

Si los resultados de la prueba del indicador no son neutros (verde), tome medidas correctivas volviendo a enjuagar todo el material de vidrio o plástico y secándolo al aire. Vuelva a analizar una pieza representativa. Documente que la medida correctiva tomada dio como resultado resultados aceptables.

- No utilice ningún material de un lote que no haya pasado la prueba pH con azul de bromotimol.
- La ejecución de la actividad se registra en el formato “R-6.3-03: CONTROL DE LIMPIEZA DE LA VIDRIERÍA”.

4.8 Esterilización de Material

El Responsable del Área y/o su delegado, realiza la esterilización del material con calor húmedo, en autoclave a 15 libras de presión (121°C), por espacio de 15 a 20 minutos.

El calor seco, es utilizado para secado y esterilización, para ello se emplea un horno a 170+/- 10° C °C por espacio de una a dos horas.

4.8.1 Control de Esterilización por lote esterilizado:

Antes del empleo del material autoclavado, se verifica la esterilidad del lote de la siguiente manera:

En cada lote esterilizado, se incluyen de dos a tres puntas de 0,1 a 1 ml, posterior al proceso de esterilización, éstas se sumergen en 50 a 100 mL de una solución de

agua peptonada u otro caldo nutritivo no selectivo; y se incuban a $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$ durante 48 horas.

Para los recipientes de muestreo se comprueba la esterilidad de al menos un recipiente por lote añadiendo aproximadamente de 50 a 100 mL de caldo estéril no selectivo (por ej., agua peptona u otro caldo nutritivo no selectivo), tape y gire el recipiente de forma que el caldo entre en contacto con todas las superficies, incube a $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$ y compruebe el crecimiento a las 48 horas. La ausencia de turbidez en el medio de cultivo permite comprobar la efectividad del proceso. No utilice los recipientes si observa crecimiento, invalide el proceso de esterilización y proceda a reesterilizar nuevamente todo el lote. Registre los resultados en R-6.3-04: CONTROL DE AUTOCLAVES”.

4.8.2 Comprobación de tiosulfato de sodio:

Compruebe al menos un envase por lote esterilizado para detectar la presencia de suficiente tiosulfato de sodio para neutralizar el cloro presente en las muestras recibidas rutinariamente en el laboratorio.

- Verifique la eficacia operativa del tiosulfato de sodio mediante el análisis comparativo de una muestra de agua clorada recolectada en un recipiente sin agente decolorante y otra recolectada en un recipiente con agente decolorante previamente adicionado.
- Verifique la presencia de cloro residual en ambas muestras mediante el método colorimétrico DPD y registre los resultados en el formato “R-6.3-04: CONTROL DE AUTOCLAVES”.
- En caso de detectarse la presencia de cloro residual en la muestra recolectada en un recipiente previamente tratado con tiosulfato de sodio, el recipiente deberá ser descartado para su uso inmediato. Posteriormente, deberá ser lavado exhaustivamente, desinfectado según el procedimiento establecido y nuevamente acondicionado con la cantidad adecuada de tiosulfato de sodio, garantizando así la neutralización efectiva del cloro antes de realizar una nueva recolección de muestra.

4.8.3 Comprobación de la fluorescencia de los recipientes.

Verifique cada lote de recipientes antes de su uso mediante inspección con luz ultravioleta de longitud de onda 365–366 nm, utilizando una lámpara de 6 vatios colocada a una distancia máxima de 12,7 cm del recipiente. Registre los resultados en el formato “R-6.3-04: CONTROL DE AUTOCLAVES”.

Si se observa una fluorescencia tenue en los recipientes, estos deberán ser remitidos a reproceso mediante lavado conforme al procedimiento establecido.

En caso de que la fluorescencia persista tras el lavado, los recipientes deberán ser descartados.

4.8.4 Control de efectividad del proceso de esterilidad con bioindicador:

El responsable del área y/o delegado, con el fin de comprobar la efectividad del proceso de esterilización; mensualmente realiza un control con ampollas de control biológico en un autoclave durante 15 a 20 minutos a 15 lb de presión, luego se incuban 48 horas a 60 +/- 2° C. La efectividad de la esterilización se verifica mediante la conservación del color violeta inicial de la ampolla. El viraje de color violeta a amarillo indica el crecimiento de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC y la ineficiencia del proceso de esterilización.

Es importante cambiar mensualmente la posición de las ampollas (en la parte anterior y posterior, en la parte superior e inferior o lateral derecho o izquierdo) según el tamaño y la forma del autoclave y realizar las observaciones en el formato “R-6.3-04: CONTROL DE AUTOCLAVES”.

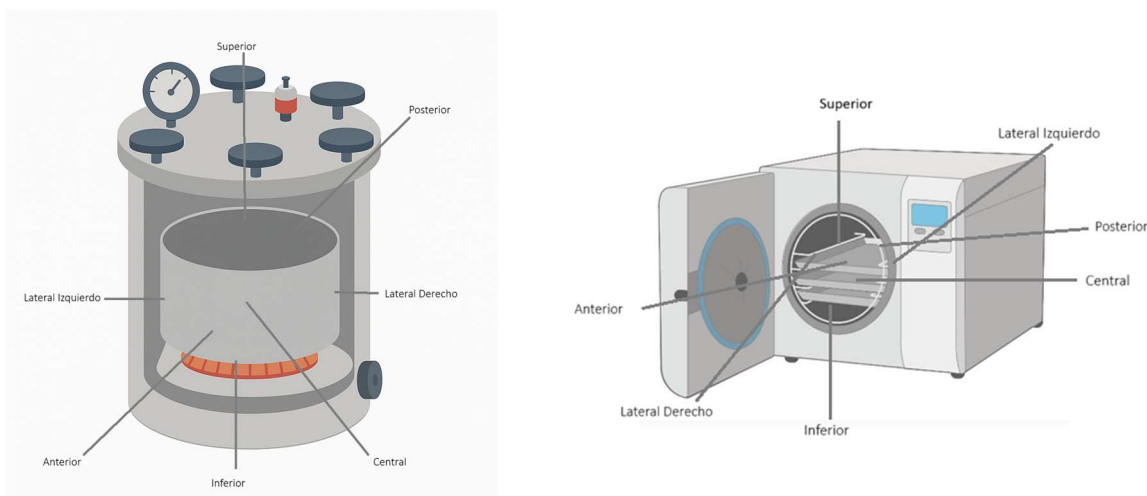


Figura 2: Posición dentro de una autoclave.

4.8.5 Control de efectividad del proceso de esterilidad con cinta indicadora:

Cada vez que una autoclave es utilizada, se realiza control de temperatura mediante la cinta indicadora de esterilidad, que se trata de una cinta impregnada con indicador químico en forma de líneas diagonales de color blanco o beige, con un nivel de adhesión superior. La cual al ser sometida a temperaturas de calor húmedo o entre 121 y 134°C, por espacio de 15 a 20 min, sus líneas diagonales viran a color negro o marrón oscuro, dependiendo de la casa comercial.

Para la esterilización por medio de calor seco, se utiliza la cinta indicadora de esterilidad, que se trata de una cinta impregnada con indicador químico en forma de líneas diagonales de color blanco o beige, con un nivel de adhesión superior. La cual al ser sometida a temperaturas de calor húmedo o entre 121 y 134°C, sus líneas

diagonales viran a color negro o marrón oscuro, dependiendo de la casa comercial.

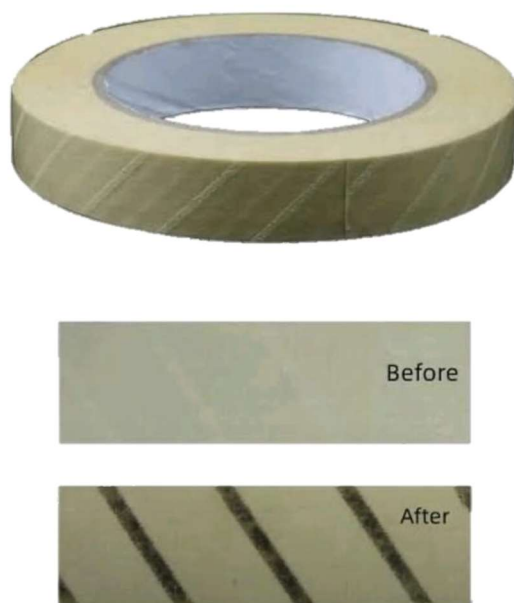


Figura 3: Descripción de control químico de esterilización, diferenciando before (antes del proceso) y after (después del proceso).

4.8.6 Comprobación de la precisión del temporizador del autoclave

Trimestralmente, se verifican los ciclos de esterilización con un cronómetro , los ciclos de esterilización de las autoclaves 0148 y 0149 son de 55 +/- 5 minutos.

La ejecución de la actividad se registra en el formato “R-6.3-04: CONTROL DE AUTOCLAVES”.

4.9 Control de Agua de Dilución

El Responsable del Área y/o delegado Verifica la esterilidad de cada nuevo lote de agua de dilución antes del primer uso agregando 50 ml a 50 ml de un caldo no selectivo de doble concentración. Alternativamente, se pasará asépticamente 100 mL o más de agua de dilución a través de un filtro de membrana el cual es cultivado en un agar no selectivo a 35 ± 0.5 ° C durante 48 h. En caso de que exista alguna contaminación, se procede a desechar el agua de dilución, se invalidan todos los datos asociados con ese lote y se verificará la fuente de contaminación. Como medida correctiva se realizará un muestreo inmediato para garantizar la obtención de resultados verídicos de las muestras que fueran procesadas con dicha agua de dilución.

4.10 Tratamiento de Desechos Biológicos.

El Auxiliar Delegado del Área respectiva inactiva el material de contaminación biológica una vez es descartado, con el fin de reducir al máximo la contaminación cruzada de otros materiales o superficies. El proceso es llevado a cabo en autoclave por un período de 15 a 20 minutos a 15 lb de presión. Terminado el proceso de inactivación, el material sólido se dispone en bolsas rojas y los desechos líquidos se disponen en jerricanes para sustancias peligrosas. Estos desechos son recogidos semanalmente por la empresa de aseo especializado (FUTURASEO RPHS S.A.S.).

La actividad de inactivación es registrada en el formato “R-6.3-04: CONTROL DE AUTOCLAVES”. La actividad de recolección de desechos es anotada en el formato “R-6.3-07: REGISTRO DE RESIDUOS PELIGROSOS”.

5. EQUIPOS DE LABORATORIO ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

5.1. Control de Temperatura de Equipos:

- El control de temperatura de los equipos será registrado en el formato “R-7.4-02: CONTROL DE TEMPERATURA DE EQUIPOS”. Dicho control se realizará dos veces al día (con un intervalo de al menos 4 horas). La documentación deberá incluir la fecha y hora de la lectura, la temperatura y firma del analista.
- Para evitar la pérdida de homogeneidad y estabilidad térmica durante el proceso de incubación de las muestras, se deberá limitar la apertura de las incubadoras a un máximo de dos veces por día. Asimismo, es fundamental que las mediciones de temperatura del equipo se realicen antes de cualquier apertura, con el fin de asegurar que los valores registrados reflejen las condiciones reales del proceso sin alteraciones debidas a la manipulación del equipo.
- Registre en el formato la temperatura que indica el set point y la temperatura corregida. Ejemplo: Si el factor de corrección se determina en +0,1 °C y la lectura del termómetro es de 44,7 °C, registre la temperatura corregida como 44,8 °C.
- Cuando sea posible, explique por qué la temperatura está fuera de tolerancia y, si corresponde, la medida correctiva adoptada (por ejemplo: corte de energía, termostato defectuoso, reemplazado el 29/11/22, mal funcionamiento del aire acondicionado, reparado el 09/10/22).
- Si la temperatura está fuera de tolerancia durante un período prolongado, registre todos los resultados de las muestras afectadas como "accidente de laboratorio”.

5.2 Horno Thermo Scientific Placa 0110:

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá		
D-7.7-01	Versión: 10	Página: 14 de 41

El horno es un equipo de laboratorio empleado para labores de calentamiento, equipado con controles de temperatura y presión, con capacidad de alcanzar hasta 250°C. Este es empleado para el secado de material del área de microbiología. El área de microbiología cuenta con un horno Thermo Scientific ubicado en uno de los mesones de microbiología a una distancia de 7 cm de la pared y a temperatura de 20 – 24°C y humedad relativa de 40 – 60%, es conectado a voltaje de 110.

Operaciones de uso:

- i. Enchufe el cable eléctrico del horno en una toma con adecuado polo a tierra. En la ventana del display, en el panel frontal, el ícono del indicador de disposición se ilumina.
- ii. Mantenga el botón *on/off* presionado durante dos segundos para encender el horno.
- iii. Una rutina de inicialización se ejecutará después de que el horno haya sido encendido. Al completarse el test del sistema de inicialización, se encenderá el display y la temperatura actual de la cámara aparecerá en el campo de visualización de temperatura.
- iv. El controlador de temperatura comienza a regular la cámara al valor teórico de temperatura especificado.
- v. Si se desea realizar cambio de la temperatura del horno se debe realizar la siguiente operación:
- vi. Presionar el botón de menú para activar la barra de menú luego se emplea el botón de  para seleccionar el ícono temperatura y presione el botón menú para confirmar la operación.
- vii. En el campo de visualización de la temperatura, presione los botones en forma de flecha para programar un nuevo valor teórico de temperatura y finalmente presione menú para confirmar el valor.
- viii. La pantalla regresa a su modo predeterminado. La temperatura real medida en la cámara y mostrada en el área de visualización de temperatura comienza a cambiar hasta que alcanza el valor teórico recientemente programado.
- ix. Se carga la cámara del horno con la muestra que se desea secar.
- x. Una vez secada la muestra y cuando la temperatura disminuya, estos recipientes son extraídos de la cámara.
- xi. Para apagar el horno, mantenga el botón *on/off* presionado durante dos segundos.

- xii. La ventana del display desaparece, excepto el ícono de disposición y la lectura de la temperatura de calor residual en caso de que la temperatura de la cámara sea todavía $>$ o igual 50°C . El horno entonces se apagará.
- xiii. Si es necesario, desenchufe el cable de alimentación para apagar completamente el horno.

5.3 Incubadoras

5.3.1 Incubadora Binder Placa 0047:

La incubadora marca Binder grande con placa 0047 se encuentra situada en el área de microbiología en uno de los mesones principales, a temperatura ambiente sugerida por la empresa fabricante (5 a 40°C), a una humedad relativa que oscila entre 40 - 60% (humedad máxima sugerida por el fabricante 70%), se encuentra alejada de la pared por una distancia de 5 centímetros y de otros equipos por más de 16 centímetros. La incubadora es usada para promover el crecimiento de microorganismos en medio de cultivo y para los múltiples análisis de microorganismos que se realizan en el área de microbiología de realizan.

Operaciones de Uso:

- i. Comprobar el subministro de la red. El valor debe corresponder al voltaje 110 requerido $\pm 5\%$. Si el valor esta por fuera del tolerado, la unidad no se debe conectar sin una maquina en serie.
- ii. Conecte el enchufe. La luz led se ilumina.
- iii. Presiones el botón de encendido hasta que la luz del display se encienda. El display muestra la temperatura actual de la incubadora.
- iv. La configuración de la temperatura se realiza oprimiendo el botón , el display de la incubadora muestra "SP" por aproximadamente un segundo.
- v. Para cambiar el valor de la temperatura se emplean los botones de flecha hacia arriba, si se desea aumentar la temperatura; y el botón de flecha hacia abajo, si se desea disminuir la temperatura actual de la incubadora. El rango de temperatura que emplea la incubadora va desde 5 a 100°C .
- vi. Presiona el botón  para confirmar la temperatura y retornar al valor de temperatura actual.
- vii. Para apagar la incubadora, se debe presionar el botón de apagado-encendido

hasta que el display se apague, posteriormente se debe desenchufar la autoclave.

Limpieza y Desinfección:

- i. Para la desinfección y limpieza de la superficie de la incubadora se debe emplear soluciones con efectos no corrosivos como agua, alcohol o desinfectantes alcohólicos.
- ii. En caso de que se presenten impurezas en el interior de la incubadora con sustancias químicas o biológicas peligrosas hay tres posibles procedimientos. Para cada método de descontaminación se debe tener cuidado y usar adecuado equipo de seguridad personal. El procedimiento correcto depende de la constitución del contaminante y de la carga de material.
- iii. Unidades de serie ED y FD pueden ser esterilizadas calentándolas 190°C por 30 minutos. Todos los materiales inflamables deben ser removidos del interior de la incubadora antes de llevar a cabo este procedimiento.
- iv. La cámara interior puede ser rociado con desinfectantes libres de ácido. La unidad debe ser desconectada de la fuente de poder durante su descontaminación. El enchufe debe estar desconectado. Antes de encender la incubadora la unidad debe estar completamente seca y ventilada, porque gases explosivos se pueden generar durante el proceso de descontaminación.
- v. Las partes de la cámara interna que se encuentren fuertemente contaminadas puede ser removidas si es necesario por un ingeniero para su posterior limpieza, o removidas y reemplazadas por nuevas partes. Las partes internas de la cámara pueden ser esterilizadas en un esterilizador o una autoclave.

5.3.2 Incubadora Binder pequeña Placa 0048:

La incubadora marca Binder se encuentra situada en el área de microbiología en uno de los mesones principales, a temperatura ambiente sugerida por la empresa fabricante (5 a 40°C), a una humedad relativa que oscila entre 40-60% (humedad máxima sugerida por el fabricante 70%), se encuentra alejada de la pared por una distancia de 5 centímetros y de otros equipos por más de 16 centímetros.

Operaciones de Uso:

- i. Antes de iniciar las operaciones verificar que las especificaciones de electricidad coincidan con la de la máquina.
- ii. Colocar la perilla de encendido en la posición I, el bombillo verde se enciende automáticamente.

- iii. Configura la perilla de termostato en la temperatura deseada.
- iv. La lámpara amarilla se encenderá indicando que se está calentando el interior del equipo. Cuando se llega a la temperatura de trabajo, la iluminación intermedia de la lámpara indicará que el termostato está operando.

En el capítulo 9020 B SM Ed 24 se encuentran especificadas las consideraciones de uso y control que se deben tener para las incubadoras de convección por humedad o forzada mecánica de aire caliente entre las cuales se encuentran:

5.4 Autoclave manual y semiautomática:

5.4.1 Autoclaves semiautomáticas Placa 0148 y 0149:

Las autoclaves semiautomáticas STURDY son empleadas para garantizar la esterilidad del material y medios de cultivos empleados en el área de microbiología. El laboratorio cuenta con dos autoclaves semiautomáticas que se encuentran ubicadas en el área de lavado, en uno de los mesones a distancia de 5 cm o más entre la máquina y la pared, el voltaje empleado es de 220.

El agua empleada para la esterilización del material, siempre es agua destilada, la cual es agregada dentro del tanque de agua y no debe sobrepasar el nivel superior indicado en el indicador de nivel de agua.

Operaciones de Uso:

- i. Abrir la puerta de la autoclave y poner en posición abierta la válvula de llenado de agua hasta que el nivel de agua cubra completamente el calentador que esteriliza los instrumentos que están en la bandeja, caja de esterilización o soporte dentro de la campana. No olvidar colocar un indicador de esterilidad en los recipientes o en la bandeja.
- ii. Poner la perilla de control de temperatura en la temperatura de esterilización deseada, ya sea 121 °C o 134 °C.
- iii. Poner los instrumentos que necesitan ser esterilizados dentro de la campana de esterilización, en la caja de esterilización de la autoclave.
- iv. Cerrar la puerta y ajustar la perilla de seguridad de la misma.
- v. Seleccionar el tiempo de secado, según lo requerido.
- vi. Oprimir el botón de encendido para empezar con el proceso de esterilización.
- vii. El botón de encendido y de calentamiento se encienden.

- viii. El medidor de tiempo de esterilización comienza a funcionar.
- ix. El medidor del tiempo de secado comenzará a funcionar cuando el medidor de tiempo de esterilización se apague.
- x. La alarma de esterilización se encenderá por 40 segundos una vez el proceso de esterilización haya terminado.
- xi. Antes de abrir la puerta de la autoclave es necesario cerciorarse de que la presión de la campana este en posición de cero.
- xii. Una vez esterilizado el material es importante verificar el indicador de esterilidad.
- xiii. Antes de sacar el material abrir la puerta y permitir que el material se enfríe durante 20 minutos como mínimo.
- xiv. Proceda a sacar la muestra.

5.4.2 Autoclave manual u Ollas de esterilización:

La olla de esterilización o autoclave manual es empleada para la inactivación del material incubado o contaminado que sale del área de microbiología. Este equipo se encuentra ubicado en el área de lavado, en el mesón derecho y retirado por más de 10 centímetros de la pared.

Operaciones de Uso:

- i. Esta unidad debe encontrarse en un ambiente de 5-40°C, los niveles de turbiedad son de 80%.
- ii. Retire la cubierta del esterilizador, girando la tuerca mariposa de quelita con movimiento antihorario. Siempre desenrosque dos tuercas mariposas al mismo tiempo.
- iii. Retire el recipiente metálico o canasta de aluminio del interior del esterilizador.
- iv. Asegúrese de que el soporte de acero inoxidable esté en el fondo del esterilizador y que la apertura del anillo exterior está ubicada en el área del elemento calentador.
- v. Coloque agua destilada hasta una altura no menor de 2" (pulgadas) ni mayor que 2 ¾" en el fondo del esterilizador y directamente sobre el elemento calentador, no agregar el agua dentro del recipiente de aluminio.
- vi. Coloque el organizador del recipiente interior en el fondo del recipiente, con el labio o reborde hacia abajo.

- vii.** Coloque los elementos a esterilizar dentro del contenedor de aluminio o canasta.
- viii.** Asegúrese de que el canal para el tubo de salida de aire (ubicado en el interior del recipiente) esté en su posición en el lado derecho del recipiente, cuando lo coloque en la unidad.
- ix.** Ponga la tapa del esterilizador en la unidad.
- x.** Apriete parejo las mariposas en la tapa, siempre apretando dos mariposas opuestas al tiempo.
- xi.** Enchufe el cordón al tomacorriente de 110 V.
- xii.** Al poner el interruptor en posición ON, la luz del bombillo rojo se enciende indicando que la unidad tiene corriente y que el calentador está trabajando.
- xiii.** Abra la válvula de control. Es importante que el vapor se deje escapar de la unidad por lo menos de 5 a 7 minutos o hasta que se observe un flujo continuo de vapor.
- xiv.** Cierre la válvula de control.
- xv.** Para aumentar el calor gire la perilla de control de calor en el sentido de las manecillas del reloj, para disminuir el calor, gírela en sentido contrario a las manecillas del reloj, cuando el manómetro alcance la presión de trabajo de 17-21psi, gire la perilla en el sentido contrario a las manecillas del reloj para reducir el calor.
- xvi.** El periodo de esterilización empieza cuando la aguja del manómetro del vapor a presión se registra en la banda verde de esterilización la cual se puede ver en la banda del manómetro (17-21PSI).
- xvii.** Al finalizar el periodo de esterilización ponga el conmutador de ON/OFF en OFF y mueva la palanca en el control de la válvula hacia arriba en posición vertical para que el vapor pueda escapar.
- xviii.** Cuando la presión del manómetro indique cero, afloje las mariposas por parejas girando opuestas al mismo tiempo en sentido contrario a las manecillas del reloj.
- xix.** Las mariposas, los mangos laterales y el mango de la tapa estarán calientes. Siempre use almohadillas para objetos calientes cuando esté operando el esterilizador.
- xx.** Extraiga el material estéril.

- xxi.** Cuando ha terminado de usar el esterilizador, es necesario sacarle el agua a la unidad, enjuagarlo y secarlo completamente. Este procedimiento deberá realizarse diariamente o cada vez que el dispositivo es empleado.
- xxii.** Se recomienda emplear únicamente agua destilada, en caso de no contar con esta se puede usar agua local, si el agua contiene altos contenido de minerales es importante limpiar periódicamente la unidad para remover y prevenir la deposición de estos en su interior. Se recomienda usar vinagre para limpiar y remover los minerales que se puedan depositar en la autoclave, para este llene el esterilizador con una solución 2% de vinagre blanco por encima del límite normal de trabajo y déjelo actuar por varios minutos y enjuáguelo totalmente.

5.5 Cabina de Flujo Laminar Horizontal Placa 0033:

La cabina de flujo laminar Horizontal se encuentra situada en el área de siembra del área de microbiología sobre un mesón plano aislado en un cuarto con el fin de evitar contaminación durante la siembra de muestras. La cabina es empleada usualmente para muestras de agua potable.

Operaciones de Uso:

- i.** Descontaminar la superficie de trabajo de la cabina de flujo laminar con desinfectante.
- ii.** Tapar la cabina con el protector de UV y encender la luz UV durante mínimo 20 minutos.
- iii.** Apagar la UV y dejar la cabina apagada por 30 minutos.
- iv.** Retirar el protector de UV de la cabina antes de empezar a trabajar.
- v.** Prender el ventilador y dejarlo encendido durante 10 o 15 minutos con el fin de purgar la contaminación del aire del área de trabajo.
- vi.** Preparar una lista de chequeo de los materiales y aparatos de uso inmediato.
- vii.** Realizar el trabajo lentamente y metódicamente, con el fin de evitar situaciones de riesgo. Colocar los materiales en posición adecuada (retirada de la rejilla).
- viii.** Lavar las manos con jabón antibacterial.
- ix.** Usar elementos de protección como batas de laboratorio, guantes y gafas cuando se vaya a trabajar en la cabina de flujo laminar horizontal.
- x.** Dejar encendido el ventilador de la cabina durante el tiempo que se trabaje en esta, teniendo cuidado de que las RPM de se encuentren entre 85-96.

- xi. Descontaminar las superficies después de terminar las siembras del día con alcohol al 70% u otro tipo de desinfectante dependiendo de las necesidades y usar UV si se emplean materiales muy contaminados. No usar desinfectantes que contengan cloro, ya que, pueden corroer y ocasionar daños irreparables en la estructura de la cabina.
- xii. Una vez desinfectada la cabina y usada la UV dejar el protector de UV puesto en la cabina hasta que ésta sea empleada nuevamente, con el fin de evitar posibles contaminaciones.
- xiii. Verificar la competencia de la luz UV periódicamente.
- xiv. Realizar el proceso de desinfección semanalmente alternando el uso del desinfectante.

5.6 Sellador Quanti tray Placa 0119:

El sellador IDEXX Quanti-Tray modelo 2X es un instrumento motorizado con rodillo calentado, diseñado para sellar IDEXX Quanti-Tray. El sellador se usa con Quanti-Tray y con cualquier IDEXX en formato de 100mL, tales como Colilert, Colilert 18, Colisure, Enterolert, Pseudalert y HPC para Quanti-Tray, para automatizar el manejo de muestras para recuento bacterial.

El equipo se emplea para análisis de muestras de agua incluyendo agua tratada potable. Este se encuentra situado en el área de siembra para aguas crudas, en una superficie nivelada conservando el espacio necesario para que las bandejas puedan ser introducidas y sacadas.

Operaciones de Uso:

- i. Acoplar el estante de entrada al sellador, introduciendo las pestañas del estante en las dos ranuras frontales del sellador y presionando para que quede firmemente posicionado.
- ii. Verificar que el interruptor esté en posición de apagado.
- iii. Enchufar el cordón de alimentación eléctrico en el sellador y el otro extremo en un tomacorriente con polo a tierra y el voltaje de 110v.
- iv. Encender la unidad con el interruptor. La luz ámbar de encendido debe quedar iluminada.
- v. Dejar que el sellador se precaliente y que la luz verde de preparado se encienda (hasta 20 minutos). El sellador no funcionará hasta que no se iluminan tanto la luz ámbar de encendido como la luz verde de preparado, indicando que la unidad

ha alcanzado la temperatura de funcionamiento.

- vi. Colocar un suplemento de goma de Quanti-Tray o Quanti-Tray/2000 en el estante de entrada, con la abertura grande orientada hacia el lado opuesto al sellador.
- vii. Colocar una bolsa Quanti-Tray o Quanti-Tray/2000 llena con la muestra y reactivo Defined Substrate Technology (DST) sobre el suplemento de goma, verificando que quede bien asentado y con cada cavidad de la bandeja en el correspondiente agujero del suplemento de goma.
- viii. Desplazar el suplemento de goma con la bandeja en el sellador hasta que el mecanismo motorizado lo tome y comience a empujarlo hacia el interior del sellador.
- ix. En un periodo aproximado de 15 segundos, la bandeja será sellada y expulsada parcialmente por la parte trasera del sellador. Sacar inmediatamente el suplemento de goma y la bandeja por la parte trasera del sellador.
- x. Apagar y desconectar el sellador cuando no sea usado.

5.7 Lámpara de UV Placa 0118:

La lámpara de UV se encuentra ubicada en uno de los mesones del área de microbiología al lado del sellador Quanti-tray, se emplea para determinación de fluorescencia, su principal uso es para el conteo y detección de los *E. coli* presentes en las muestras de agua sembradas con colilert 18.

Operaciones de Uso:

- i. Verificar que la fuente de energía corresponda al voltaje de 110v.
- ii. Conectar el enchufe a la fuente de poder.
- iii. Tomar uno de los pozos sembrados por colilert y colocarlo dentro de la lámpara.
- iv. Ponerse las gafas que vienen con el equipo (gafas oscuras) que permite protegerse contra la luz UV.
- v. Encender el botón de On/off que se encuentra situado en la parte superior del equipo.
- vi. Hacer el respectivo conteo de los pozos que presenten fluorescencia característica de *E. coli* para el método.
- vii. Una vez terminada la lectura de las muestras positivas, oprimir el botón de apagado.

- viii. Desconectar el equipo de la fuente de poder.
- ix. Limpiar el equipo con desinfectante libre de ácido.

5.8 Micropipetas

Las micropipetas son instrumentos de laboratorio de alta precisión diseñados para dispensar volúmenes extremadamente pequeños.

Operaciones de uso:

- i. Deben usarse con puntas de precisión estériles suministradas por el fabricante o equivalentes que se ajusten de manera segura al cono de la punta para garantizar un sellado hermético.
- ii. Mantenga una consistencia en la técnica de pipeteo, incluyendo el pre-humedecimiento, la liberación del émbolo y la profundidad de inmersión de la punta (entre 1 y 3 mm).
- iii. Opere solo en posición vertical y asegúrese de que tanto la muestra como el equipo estén a la misma temperatura.
- iv. Evite ajustar la micropipeta más allá del rango recomendado por el fabricante, ya que esto puede causar daños mecánicos.
- v. Siga las instrucciones del fabricante para realizar el mantenimiento de rutina, como la limpieza, el reemplazo de sellos y la lubricación. Verifique la precisión y la precisión del volumen dispensado por cada micropipeta antes del primer uso después de la compra, el mantenimiento o la reparación, y con una frecuencia relacionada con su uso (por ejemplo, trimestralmente o antes si la micropipeta muestra signos evidentes de falta de precisión o si cambia el fabricante de las puntas).
- vi. Calibre al menos anualmente, ya sea internamente o mediante el fabricante.
- vii. Registre los resultados de la calibración.
- viii. Si se utiliza agua para calibrar o verificar la precisión de la micropipeta, recuerde que los cambios en la viscosidad del líquido pueden afectar el volumen dispensado.

5.9 Balanza Analítica placa 1070:

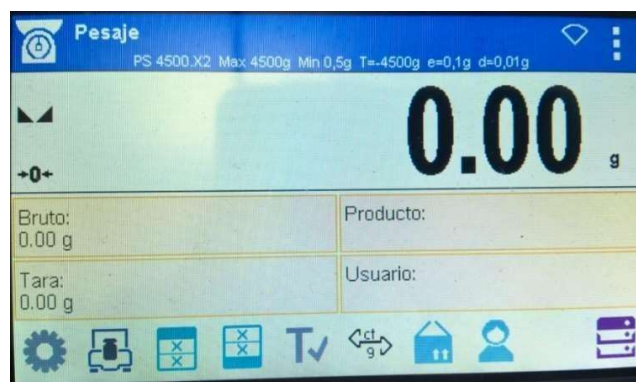
La balanza analítica es un instrumento que permite la medición de peso de objetos, sustancias o reactivos de forma sencilla y precisa. Es empleada en el área de

microbiología para el pesado de los reactivos, medios y sustancias empleadas durante los ensayos microbiológicos.

La balanza se encuentra ubicada en el cuarto de balanzas del área de fisicoquímica, nivelada adecuadamente y es verificada a inicio de semana para garantizar su correcto funcionamiento, para este procedimiento se emplean “D-6.4-01: VERIFICACIONES INTERMEDIAS DE EQUIPOS DE MEDICIÓN Y/O ENSAYO”, y se anota en el formato “R-6.4-04: VERIFICACIONES INTERMEDIAS DE BALANZAS”. El cuarto de balanzas es un lugar aislado en donde se garantiza que las balanzas no entrarán en contacto con elementos que puedan incidir negativamente sobre el pesado. Cada balanza es limpiada después de su uso y se recomienda no tener material cerca de estas ya que, puede generar problemas en el proceso de medición.

Operaciones de Uso:

- i. Antes de emplear la balanza es importante verificar que esta se encuentre limpia y nivelada. La nivelación se verifica mirando el indicador de nivel que se encuentra en la parte posterior de la misma, este debe estar en todo el centro.
- ii. Conecte el enchufe de la balanza a una fuente de poder con voltaje de 110 v. instantáneamente la LED del botón encendido se enciende.
- iii. Pulse el botón  situado en la parte superior izquierda de la caja, después del procedimiento de inicio se ejecutará automáticamente la ventana principal del programa que se observa en el display de la balanza.
- iv. La balanza se inicia en el estado no ha iniciado sesión (sin usuario), para iniciar el trabajo.
 - a. Inicio de sesión.
 - b. En la pantalla táctil de la balanza aparece la siguiente información:



- c. Para realizar el ajuste de las funciones de la balanza se debe oprimir el botón de configuración -  - en donde tendremos acceso a las funciones más

detalladas del equipo que van desde el pesaje y las unidades hasta la calibración, interna, externa y la conectividad de la balanza, entre otras más funciones (es mejor que una persona especializada en manejo de equipos lleve a cabo esta operación).

- d. Para cambiar la unidad de medida basta tocar la unidad en la pantalla tantas veces sea necesario hasta que lleguemos a la unidad requerida.
- e. Para realizar el pesaje de las muestras, asegurarse de que la medida inicial de la balanza esté en ceros.
- f. Si se desea realizar pesaje de sustancias líquidas o reactivos es importante usar un recipiente (vidrio reloj, Erlenmeyer, breaker o papel aluminio, etc) en donde se puedan depositar. El procedimiento adecuado sería colocar el recipiente tarar – oprimiendo la letra T del tablero y posteriormente comenzar a pesar la cantidad de material requerido.
- g. Pese la sustancia de interés, cuando se muestre el marcador , se puede leer el resultado del pesaje.
- h. Para garantizar mediciones más exactas cierre la puerta del cuarto de balanzas y trate de tener el mínimo de objetos sobre el mesón de las balanzas y que los implementos que tenga sobre esta estén retirados.
- i. Es importante dejar el mesón y balanza limpia y libre de objetos una vez se termine con el proceso de pesado.
- j. Si durante el resto del día no se necesita emplear más la balanza se procede al apagado de la misma.
- k. Para apagarla oprima el botón  y desconecte la balanza.

5.10 Vortexer Placa 1069:

El vortexer o agitador es empleado para mezclar y agitar soluciones en tubos de ensayo u otros recipientes. Este dispositivo es un agitador de laboratorio compacto con 4 posiciones y 3 controles de velocidad -Off: apagado, 1000, 2000 y 3000 rpm- que puede agitar microplacas y 6 tamaños de tubos diferentes.

Operaciones de uso:

Modo intermitente/ por contacto:

- i. Colocar el interruptor de 3 posiciones en la posición intermitente por contacto.
- ii. Poner la perilla de control de velocidad en 3000 rpm o en la que se desee.

- iii. Presione hacia abajo un tubo de ensayo o recipiente que se desee mezclar y agitar en el área central del cabezal de mezcla, mientras el tubo se sostiene firmemente en la parte superior.
- iv. Cuando se libere la presión del cabezal de mezcla, el instrumento se detendrá.
- v. Poner el interruptor en Off una vez se termine de mezclar el tubo o sustancia de interés.
- vi. Desconectar el equipo.

Modo Manos libres/encendido continuo:

- i. Poner el interruptor de 3 posiciones en la posición ON inferior (II).
- ii. Poner la perilla de control de velocidad en la posición de 3000 rpm o en la que sea deseada.
- iii. El modo de manos libres permite mezclar o agitar los tubos o las microplacas y continuará funcionando hasta que detenga el mezclador poniendo el interruptor de 3 posiciones en OFF (O).
- iv. Una vez finalizado el uso apagar el equipo.

5.11 Equipo de Filtración (base vacuum manifold – Placas 1080 y 0040, bomba de vacío –Placa 1074):

Base:

Lavar con detergente estándar de laboratorio y cepillo para botellas. Enjuagar la base manifold con agua destilada o desionizada después de cada uso. Las unidades pueden ser desarmables para el proceso de limpieza

Para desinfectar la base manifold es necesario tomar 10 ml de agua estéril o desionizada con una pipeta y depositarlos en el cuerpo de la base manifold, sellar la conexión con el vacío y sellar cada uno de los aberturas de la base con papel Kraft u otro papel permeable.

Para esterilizar la base manifold es necesario abrir todas las válvulas en posición vertical. Autoclavar a 121°C durante 20 minutos.

Operaciones de uso:

- i. Conectar el final de la base de manifold con una manguera al Erlenmeyer usado como trampa de vacío y conectar este último con una manguera a la bomba de

vacío. Asegúrese que el sistema esté cerrado.

- ii. Pruebe el sistema de vacío para identificar alguna fuga de aire. Coloque adecuadamente el sistema de filtración (la base del vaso de filtración, el filtro y el vaso).
- iii. Apriete el sistema de filtración con las pinzas o ajuste según sea el sistema de filtración. Añadir la muestra al vaso de filtración.
- iv. Encienda la bomba de vacío y cada una de las válvulas de los puestos de filtración.
- v. Cuando la filtración sea completada, las válvulas pueden ser cerradas para remover los filtros.
- vi. Filtre agua destilada estéril con el fin de limpiar la base de manifold.
- vii. Desmonte el sistema de filtración y desconecte la bomba de vacío y cierre las válvulas de la base poniéndola en forma horizontal.

5.12 Baño María Memmert Placa 0122:

El baño maría se encuentra situado en el área caliente en una superficie plana a una distancia de 100 mm de la pared.

Operaciones de uso:

- i. Llenar el baño maría con el líquido necesario para la realización de la prueba, el llenado no puede estar por encima de los 10mm de la aleta radiante superior.
- ii. Conectar el Baño María a la fuente eléctrica, la conexión empleada para este equipo es de 110 v.
- iii. Presionar el botón ON para encender el mando de control del equipo, una vez encendido el baño maría el bombillo verde de *power* será encendido.
- iv. Situar el mando de control de temperatura a la temperatura requerida, teniendo en cuenta la corrección de la temperatura estimada durante la calibración del equipo. En caso, de que el baño maría sea empleado para la determinación de coliformes termotolerantes, la temperatura que se empleará será de 44,5°C.
- v. Una vez es ajustada la temperatura, la lámpara de señalización amarilla se encenderá de forma intermitente indicando que el equipo está calentando. Cuando se alcanza la temperatura constante final la señal amarilla de calentamiento (heat) se estabiliza.

- vi. Durante el calentamiento se recomienda cerrar el baño maría para evitar la pérdida del calor y garantizar que permanezca constante la temperatura de este.
- vii. Cuando se alcance la temperatura deseada, se ponen los tubos de medio de cultivo dentro del baño maría para empezar con el proceso de incubación.
- viii. Una vez se finaliza la incubación de los microorganismos el baño maría es apagado y las muestras sacadas de este.
- ix. El agua empleada durante el proceso de incubación se extrae por medio del desagüe que está situado en la parte inferior del baño maría.
- x. El baño maría es limpiado con detergente extrán como se menciona en P-5.3-01 Limpieza y Desinfección del Laboratorio de Análisis de Agua.

5.13 Verificaciones Intermedias:

5.13.1 Equipos de Temperatura

La verificación intermedia de los equipos críticos de microbiología (Incubadoras, Hornos y Neveras) es llevada a cabo trimestralmente según lo establecido en el documento “D-6.4-01: VERIFICACIONES INTERMEDIAS DE EQUIPOS DE MEDICIÓN Y/O ENSAYO”, y registradas en el formato “R-6.4-02: VERIFICACIONES INTERMEDIAS DE EQUIPOS DE MEDICIÓN DE TEMPERATURA”.

5.13.2 Material Volumétrico Convencional

La verificación intermedia del material volumétrico convencional (Micropipetas y probetas) es llevada a cabo periódicamente según lo establecido en el documento “D-6.4-01: VERIFICACIONES INTERMEDIAS DE EQUIPOS DE MEDICIÓN Y/O ENSAYO”, y anotada en el formato “R-6.4-10: VERIFICACIONES DE MATERIAL VOLUMÉTRICO CONVENCIONAL Y DE PRECISIÓN”.

5.13.3 Balanzas

La verificación de las balanzas es llevada a cabo una vez por semana por un operario calificado del área de fisicoquímica según el documento “D-6.4-01: VERIFICACIONES INTERMEDIAS DE EQUIPOS DE MEDICIÓN Y/O ENSAYO”, y anota en el formato “R-6.4-04: VERIFICACIONES INTERMEDIAS DE BALANZAS”.

5.14 Calibración de Equipos:

La calibración de los equipos del laboratorio en uso es llevada a cabo de 12-18 meses según las indicaciones del fabricante y anotada en el formato “R-6.4-06: NECESIDADES DE MANTENIMIENTO Y/O CALIBRACIÓN DEL LABORATORIO

DE ANÁLISIS DE AGUA”.

6. SUMINISTROS DE LABORATORIO

6.1 Bandeja multicelda para colilert - Quanti Tray:

Se realiza una prueba de esterilidad según lo indicado en el método “R-7.2-33: MÉTODO ANALÍTICO PRUEBA ENZIMA SUSTRATO PARA COLIFORMES TOTALES Y ESCHERICHIA COLI, SM 9223 B, 4c. VARIABLE MULTICELDA”. Esta prueba se realiza mediante la adición de 100mL de caldo BHI u otro medio no selectivo a la bandeja multicelda, la cual es sellada e incubada a $35 \pm 0,5$ °C durante 48 horas. La ausencia de crecimiento indica que hay condiciones de esterilidad, si la bandeja está turbia significa que el procedimiento no fue desarrollado en condiciones estériles este control se realiza cada que se abre una nueva caja o un nuevo lote de reactivo colilert 18. El control de calidad del sellador se realiza mensualmente, añadiendo una o dos gotas de colorante de alimentos (anilina vegetal) a 100mL de agua destilada estéril y llevando la bandeja al sellador, el análisis consiste en identificar si alguno de los pozos está roto o no fue sellado correctamente. La limpieza y mantenimiento preventivo del sellador se realiza cada año.

El control de calidad realizado para la bandeja multicelda se registra en el formato “R-7.4-29: CAPTURA DE DATOS COLIFORMES ENZIMA SUSTRATO” en orden cronológico.

6.2 Control de calidad del agua empleada en microbiología

El agua que se utiliza para microbiología es monitoreada con regularidad y debe cumplir con los siguientes valores aceptables para parámetros químicos y biológicos.

CALIDAD DE AGUA USADA EN MICROBIOLOGIA		
Prueba	Frecuencia	Valor Limite aceptable
Conductividad a 25°C	Diariamente	<2 µmho /cm
Carbono Orgánico total	Mensualmente	<1,0 mg/L
Metales pesados (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn)	Anualmente	<0,05 mg/L
Metales pesados totales	Anualmente	<0,10 mg/L
Cloro Residual Total	Diariamente	<0,1 mg/L
Mesófilos	Mensualmente	<500 UFC/mL o <500 NMP/mL

Tabla 9020:II. Quality of Reagent Water Used in Microbiology del *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (24ª edición, 2023).

El control del agua empleada en el área de microbiología es registrado en el formato “R-7.4-04: CONTROL DE LAS CONDICIONES DE CALIDAD DEL AGUA”.

6.3 Control de calidad de Lámpara UV:

La lámpara de UV que se encuentra en la cámara de flujo laminar horizontal ubicada en área de siembra de microbiología, es limpiada mensualmente con alcohol isopropílico o alcohol al 70%.

La verificación de la eficiencia se realiza trimestralmente, conforme al siguiente procedimiento establecido para asegurar el desempeño óptimo del equipo:

- Prepare un cultivo de *E. coli* en agua peptona tamponada para obtener un recuento de 100 a 200 UFC por ml.
- Añada 0,1 ml a dos placas de Plate count.
- Exponga una placa a la luz ultravioleta durante dos minutos. No exponga la otra.
- Incube ambas placas a $35 \pm 0,5$ °C durante 48 ± 3 horas.
- Contar cada placa y registrar, determine el porcentaje de inhibición dividiendo el recuento de expuestos entre el de no expuestos, multiplicándolo por 100 y restando el resultado de 100.

Ejemplo:

Recuento de expuestos = 2

Recuento de no expuestos = 208

$2 \div 208 = 0,0096$

$0,0096 \times 100 = 0,96$

$100 - 0,96 = 99,04$ %.

- El porcentaje de muerte debe ser igual o superior al 99 %.

Se debe llevar registro de las horas de uso de la lámpara UV, a fin de monitorear su vida útil, la cual para las cabinas de flujo laminar es de 5000 horas. No obstante, si aún no se ha cumplido este tiempo y la cabina no llegase a cumplir con la reducción del 99% del microorganismo control, se debe proceder cambio de la lámpara. Las horas de uso se registran mensualmente.

El control de calidad de la lámpara de UV y su periodo de vida útil, son registrados en el formato “R-7.7-03: CONTROL CABINA DE FLUJO LAMINAR HORIZONTAL”.

a. Filtro de membrana de celulosa

Los filtros de celulosa estériles, se emplean para el control del agua de dilución y para las técnicas de filtración por membrana. Su inocuidad es controlada por lote de filtro abierto en agar plate count a 35°C de 48 ± 3h. La evidencia se registra en el formato “R-7.4-21: CAPTURA DE DATOS MESÓFILOS”.

b. Medios de cultivo y sustratos enzimáticos

Los medios de cultivos deshidratados son almacenados en el área de microbiología, donde se cuenta con las condiciones ambientales adecuadas para su conservación. Estos no deben emplearse si están vencidos o se observa pérdida de coloración o de alguna de sus características.

Preparación: Antes de la preparación del medio de cultivo, se lee con detenimiento las instrucciones de fabricación impresas en el envase.

- Después de realizar el pesaje, rehidrate el medio sin sobrepasar dos horas entre su rehidratación y esterilización, evitando así la proliferación de microorganismos presentes; los medios son rehidratados con agua destilada estéril.
- La temperatura y tiempo de esterilización se encuentran impresas en la etiqueta del medio.
- Para los medios de cultivo que no requieren esterilización, se emplea el procedimiento de preparación del fabricante.
- Antes del proceso de esterilización o calentamiento, según sea el caso, se realiza lectura del pH y posteriormente a este proceso, se realiza lectura nuevamente.

Se emplean cepas de referencia para los controles de calidad de los medios de cultivo o sustratos enzimáticos empleados en microbiología (Colilert, readycult, etc). Durante estos ensayos se determina la especie-especificidad del medio con el fin de garantizar que cumpla con los requerimientos para la identificación del microorganismo diana. El procedimiento para los controles positivos y negativos de los medios de cultivo (deshidratados, sustratos enzimáticos, entre otros) se especifica en cada uno de los métodos empleados en el área de microbiología.

La preparación de los medios de cultivo, y sus respectivos controles de calidad, serán registrados en el formato R-7.4-41 CONTROL DE CALIDAD MEDIOS DE CULTIVO.

TIEMPO DE CONSERVACIÓN PARA MEDIOS PREPARADOS		
MEDIO	TIEMPO	TEMPERATURA (°C)
Caldo en botellas tapa rosca	96 horas	2-8

Agar en placa con cubierta hermética	2 semanas	2-8
Agar o caldo en tubos tapa rosca	3 meses	2-8
Agar o caldo hermético en tubos sin cierre	2 semanas	2-8
Agar en caja de Petri con papel chicle	2 semanas	2-8
Grandes cantidades de agar en frasco tapa rosca	3 meses	<30

Tabla 9220:V – Holding Time for Prepared Media del *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (24ª edición, 2023) .

7. PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Para agua potable la muestra será tomada en frasco schott de vidrio, boca ancha, estéril con 0,1ml de tiosulfato de sodio al 3% por cada 120mL de muestra de agua de consumo y con 0,1mL de tiosulfato de sodio al 10% por cada 120mL de agua de piscina.

7.1 Para agua de consumo o potable con fines normativos

La muestra debe ser transportada a Temperatura $\leq 10^{\circ}\text{C}$, debe ser conservada a la misma temperatura en nevera destinada para ese propósito y debe ser analizada en un tiempo no mayor a 30 horas contadas a partir de la hora de tomada la muestra.

7.2 Agua no potable con fines normativos

Se debe transportar a Temperatura $\leq 10^{\circ}\text{C}$, no sobrepasando las 8 horas entre la toma y su llegada al laboratorio; la muestra no debe ser refrigerada, sino que al llegar al laboratorio se deja atemperar y procesar al cabo de dos horas máximo.

7.3 Para otro tipo de agua que no cumple normatividad

Las muestras deben conservarse a Temperatura $\leq 10^{\circ}\text{C}$ y no deben exceder las 24 horas entre su toma y procesamiento. No se deben almacenar las muestras de matrices de agua tratada y cruda juntas con el fin de evitar contaminación cruzada.

Las muestras para análisis microbiológico no deben alcanzar temperatura de congelación.

8. CEPAS DE REFERENCIA

Las cepas de referencia, son “material certificado caracterizado mediante un procedimiento metrológico válido para una o más propiedades especificadas, acompañadas por un certificado de especificidad, su incertidumbre asociada y una declaración metrológica” y deben ser fabricadas por proveedores acreditados en ISO 17034.

Las cepas ATCC empleadas en el laboratorio de aguas, son suministradas por proveedores externos certificados. Las cepas de referencia empleadas en el laboratorio están contempladas en el documento “D-6.6-01: ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS Y/O MATERIALES CONSUMIBLES” y su registro se lleva a cabo en el “R-6.6-01: REGISTRO DE CONTROL DE CONSUMO DE REACTIVOS Y/O MATERIALES CONSUMIBLES”

Preservación y Almacenamiento de las Cepas de Referencia

Las cepas de referencia adquiridas por el laboratorio son conservadas según las consideraciones propias de cada casa comercial y/o proveedor, antes de crear el banco de referencia las cepas deben mantenerse de 2 a 8°C en la nevera de reactivos. Es importante tener en cuenta las fechas de expiración de los cultivos comerciales adquiridos.

Las cepas de reserva, se encuentra en el ultracongelador placa 1079, para su conservación, son congeladas a temperatura por debajo de -31 °C utilizando como agente crioprotector, glicerol al 40%, en tanto que las cepas de trabajo, son refrigeradas de 2-8°C en recipiente hermético.

8.1 Montaje del Banco de Referencia

- i. Se selecciona la cepa de referencia ATCC con la cual se va a generar el banco, su manipulación se hace siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor.
- ii. La cepa es reactivada por triplicado mediante siembra por agotamiento, utilizando un medio de cultivo que cumpla con los requerimientos nutricionales necesarios para el adecuado crecimiento del microorganismo. Incubar las placas inoculadas teniendo en cuenta la temperatura y el tiempo apropiados para su reactivación.
- iii. Se verifica las características macroscópicas y microscópicas del microorganismo.
- iv. Tras la reactivación de la cepa de referencia, las colonias aisladas se inoculan en caldo BHI u otro caldo enriquecido por 12-18 horas según las condiciones de temperatura adecuadas para el microorganismo.
- v. Una vez finalizado el tiempo de incubación llevar el caldo a la cabina de

bioseguridad y mezclarlo lentamente y con mucho cuidado con una mezcla de caldo BHI + glicerol 40% preparado previamente.

- vi. Se dispensan alícuotas de 1mL del cultivo en viales o criotubos de capacidad de 1,5 a 2,0 mL, marcando cada vial con el nombre de la cepa, estas se almacenan en gradillas rotuladas con el nombre de la cepa y fecha de creación del banco.
- vii. Almacenar en el congelador de la nevera por 12 horas y posteriormente llevar al ultracongelador.

Nota: Es esencial mantener un control estricto sobre el número de subcultivos (repique o pase) realizados a partir de una cepa de referencia, con el objetivo de preservar su integridad genética y fenotípica. A partir del primer cultivo efectuado en el laboratorio, se permite un máximo de cinco repiques. Asimismo, el número total de pases no debe superar los ocho desde la cepa madre original (por ejemplo, las cepas provenientes de un proveedor a partir del pase 3 no deben exceder los 5 pases).

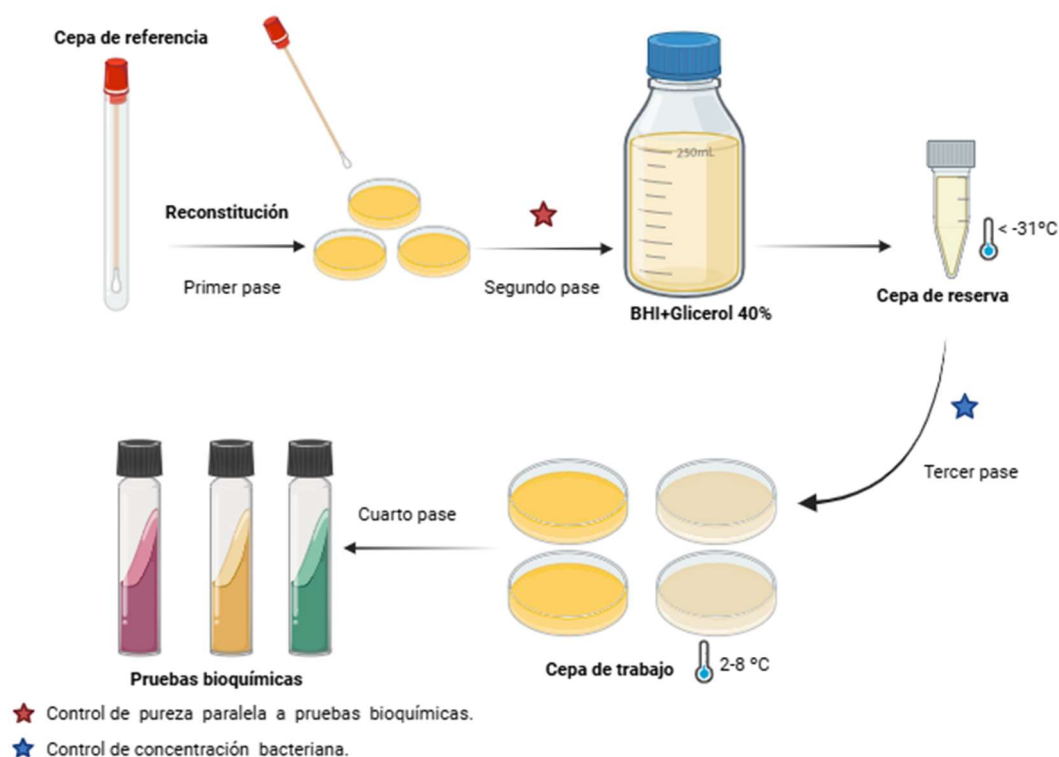


Figura 4: descripción del manejo de las cepas de referencia desde su llegada al laboratorio.

8.2 Determinación de concentración celular inicial y pureza

Para determinar la concentración inicial y la pureza de las cepas:

- i. Se Transfiere el contenido de un vial a un frasco con 9 mL de agua de dilución estéril (esta sería la dilución 10^{-1}) y se diluye hasta 10^{-8} .
- ii. De las tres últimas diluciones realizadas se dispone 1 mL sobre una placa de Petri para realizar las siembras por superficie, sembrando al menos dos placas por cada dilución.
- iii. Las placas son incubadas a la temperatura necesaria en posición invertida.
- iv. La concentración inicial de la cepa se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{mL\ muestra} = \frac{(Número\ de\ colonias)(Factor\ de\ dilución)}{mL\ sembrados\ en\ la\ placa}$$

Nota 1: Solo se determinará la concentración de las placas entre 30-300 colonias aisladas.

Nota 2: En caso de evidenciar colonias con morfología distinta a la cepa de referencia, realizar controles adicionales como tinción de Gram y evaluación del crecimiento en medios de cultivo selectivos. Si se confirma que el banco está contaminado este debe ser descartado.

8.3 Reconstitución y creación del banco de trabajo

Mensualmente se retira un vial del ultracongelador con el fin de obtener la cepa de trabajo, que se mantendrá en la nevera a una temperatura de 2 a 8°C para ser utilizado en las actividades de control de calidad.

Para la reconstitución y obtención de la cepa de trabajo se lleva a cabo el siguiente procedimiento:

- i. Se retira un vial del ultracongelador y se pasa de una o dos horas al congelador de la nevera convencional ubicada en el área de microbiología, esto con el fin de evitar un choque brusco de temperatura. Posteriormente se pasa el vial al refrigerador (2- 8°C) por espacio mínimo de dos horas. Terminada la cadena de frío el vial es llevado a la incubadora de 35-37°C durante 2 horas para favorecer atemperar.
- ii. El volumen total del vial es transferido a un caldo o se toma una asada de este y se aísla en una placa de Petri con un medio enriquecido como agar nutritivo o Plate count. El microorganismo es incubado bajo condiciones ideales de crecimiento, 35–37°C por 18 a 24 h.

- iii. Las características macroscópicas y microscópicas son verificadas y se registran en el R-5.6-04 Comportamiento de Cepas de Referencia.
- iv. Una vez verificadas las características del microorganismo, este es mantenido en las placas o tubos de cultivo por dos meses a una temperatura entre 2-8°C.

8.4 Verificación viabilidad y pureza

Bimensualmente se retira uno de los viales y se realiza el recuento para determinar la concentración del microorganismo. Su pureza se verifica sembrándolo en medios específicos para corroborar que mantenga sus características metabólicas en el tiempo.

Los tiempos de preservación de los microorganismos vs el agente crioprotector y la temperatura de conservación se encuentran anexos a los certificados de análisis de las cepas empleadas en el laboratorio de Aguas de Corpouraba. Cuando un microorganismo ha cumplido su tiempo máximo de conservación y no se ha obtenido el nuevo lote del mismo, los analistas del área de microbiología, llevaran a cabo controles de calidad mensuales con el fin de garantizar que la cepa aun cumple con los requerimientos de viabilidad, pureza y óptimo crecimiento en los medios requerido por el método para los cuales se utilice el microorganismo.

9. VERIFICACIÓN DE MÉTODOS NORMALIZADOS

Previo al inicio del proceso de verificación de métodos microbiológicos, el área de Microbiología del Laboratorio de Aguas de CORPOURABA establece un Plan de Verificación del Ensayo, el cual se documenta mediante el formato R-7.2-12: “PLAN DE VERIFICACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS”.

Una vez ejecutado el plan, los resultados y evidencias generadas durante el proceso de verificación son consignados en el registro R-7.2-13: “VERIFICACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO MICROBIOLÓGICOS”, garantizando la trazabilidad y el cumplimiento de los requisitos establecidos.

La verificación de los métodos normalizados se realiza antes de su aplicación rutinaria, con el propósito de confirmar su correcta implementación bajo las condiciones operativas del laboratorio, asegurando así la validez de los resultados obtenidos. Este proceso se ejecuta conforme al procedimiento interno P-7.2-04: “VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO MICROBIOLÓGICOS NORMALIZADOS Y NO NORMALIZADOS”, el cual se encuentra alineado con la norma ISO 13843:2017”.

Análisis cuantitativo:

En la verificación de métodos cuantitativos se evalúan parámetros críticos que permiten

establecer el desempeño del método bajo condiciones definidas. Las variables consideradas incluyen:

- Rango de trabajo: determinación del límite inferior y límite superior de cuantificación.
- Categorización del desempeño: identificación de verdaderos positivos (VP), falsos positivos (FP), verdaderos negativos (VN) y falsos negativos (FN), sensibilidad, especificidad cuando aplique.
- Criterios de precisión: evaluación de la repetibilidad, precisión intermedia (intra-laboratorio)
- Estimación de la incertidumbre expandida asociada al método, conforme a lineamientos establecidos.

Análisis cualitativo:

En la verificación de métodos cualitativos se evalúan atributos estadísticos que permiten determinar la capacidad del método para identificar correctamente la presencia o ausencia del microorganismo objetivo. Las variables a considerar son:

Especificidad: capacidad del método para identificar correctamente muestras negativas (discriminación de no dianas).

Sensibilidad: capacidad del método para detectar adecuadamente muestras positivas (detección del microorganismo diana).

Límite de detección (LOD): menor concentración del analito que puede ser detectada de forma confiable.

Tasa de falsos positivos (TFP): proporción de resultados positivos erróneos.

Tasa de falsos negativos (TFN): proporción de resultados negativos erróneos.

Eficiencia: proporción global de resultados correctamente clasificados.

Selectividad: grado en que el método responde exclusivamente al microorganismo diana frente a interferentes o microorganismos no objetivo.

El cálculo de la incertidumbre asociada a los métodos microbiológicos cuantitativos se realiza conforme a lo establecido en el procedimiento P-7.2-06: “ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS”. Los resultados de este cálculo se documentan en el formato R-7.6-02: “DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS”.

Nota: Los métodos de ensayo se verificarán nuevamente sin importar si son de naturaleza cualitativa o cuantitativa, siempre que se presente alguna de las siguientes condiciones:

- Cambio de instalaciones locativas del laboratorio.
- Cambio en el método de referencia usado para la validación.
- Cuando se efectúen una o más modificaciones que puedan generar variación en los datos analíticos.

Cuando exista cambio de analista en el área de microbiología no se realizarán nuevas verificaciones. El nuevo analista recibirá entrenamiento previo y se evaluará su competencia para operar los equipos y ejecutar los métodos antes de considerarlo competente para la realización de los análisis, y se registra en el formato “R-7.7-06: CERTIFICACIÓN DE COMPETENCIA ANALÍTICA” y “R-7.7-05: CAPACITACIÓN EN EL DESARROLLO DE ENSAYOS ANALÍTICOS”.

10. PRECISIÓN DEL MÉTODO (CARTA CONTROL)

Se calcula la precisión de los duplicados de cada parámetro validado de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- Realizar análisis de duplicados de 15 muestras positivas por tipo de agua, con cada conjunto de duplicados analizados por un solo analista.; si participa más de un analista, se incluyen todos los datos de duplicado de los analistas los cuales deben corresponder al mismo número de muestras. Cada duplicado analizado es registrado como D1 y D2.
- Calcular el logaritmo de cada resultado. Si en algún grupo de duplicados uno de los resultados es <1 , sumar 1 a ambos valores antes de calcular los logaritmos.
- Calcular el rango ($R_{\log}$) de cada par de duplicados transformados, restando el logaritmo de D1 y D2; así como la media ($\bar{R}$) de estos rangos.
- Calcular el criterio de precisión multiplicando 3,27 por el $\bar{R}$.
- Analizar una muestra por duplicado con la periodicidad establecida en cada método. Calcular el $R_{\log}$, si este es mayor al criterio de precisión calculado de los 15 datos anteriores, la variabilidad es excesiva en el laboratorio. En tal caso, descartar este lote de muestras y se realiza un trabajo no conforme. Las muestras que correspondan al lote del duplicado se tomarán nuevamente una vez haya las condiciones adecuadas para efectuar ensayos analíticos.
- El cálculo de los límites de control para la gráfica se realiza de la siguiente forma:

LSC: Límite Superior de Control: 3.27R

LIC: Límite de control: 0

LC: Línea central: R

- vii. Seguir corriendo los duplicados de las muestras, hasta completar 15 datos y recalcular un nuevo criterio de precisión.
- viii. Los resultados de los duplicados son registrados en el formato “R-7.7-04: CARTA DE CONTROL MICROBIOLOGÍA”.
- ix. Las cartas control de cada uno de los métodos se empiezan con los primeros valores obtenidos durante la verificación de cada uno de los mismos.

11. BIBLIOGRAFÍA

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. IN: LIPPS WC, BRAUNT-HOWLAND EB, BAXTER TE. EDS. STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 24TH ED. WASHINGTON DC: APHA PRESS;2023.

12. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha	Resolución	Versión	Detalle
11/08/2017	300-03-10-23-0990	01	Aprobación inicial con código y nombre “D-5.9-01: CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLOGÍA” en el Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio de Análisis de Aguas.
06/10/2017	300-03-10-23-01270	02	Modificación del numeral 5.2 Espacio de trabajo. Se incluyeron los numerales 5.5.2 siembra por hisopada en superficie, 11. Verificación de métodos normalizados y 12. Precisión de métodos (carta control).
15/08/2018	300-03-10-23-1436	03	En la sección 4. CRITERIOS DE BIOSEGURIDAD se incluyen detalles sobre descontaminación de las superficies, especificando momentos y objetivos. En la sección 5.3.3 Limpieza y desinfección de pisos y paredes se especifica frecuencia para la realización de dicha actividad. En la sección 5.5 Control Microbiológico de Ambientes: -Siembra por exposición: se especifica la concentración límite de microorganismos (UFC/min) en el aire, y se modificó la periodicidad en la realización de dicho control. -Siembra por hisopada en superficie: se modifica el procedimiento para la realización de éste, al igual que la frecuencia (pasa a ser mensual). En la sección 5.7 Control de lavado de la vidriería se cambia el indicador para verificación del lavado de la vidriería por Azul de Bromotimol. En la sección 5.9 Control de Esterilización se cambia la frecuencia de quincenal a mensual, se agrega el control mediante el uso de la cinta indicadora y se adiciona verificación trimestral del tiempo de esterilización con timer. En la sección 7.2 Control de calidad del agua empleada en microbiología se adiciona cuadro de valores máximos para parámetros a controlar de manera periódica. En la sección 7.4 Filtro de membrana de celulosa se elimina el uso de la muestra viajera al igual que el registro R-5.8-22. En la sección 9 PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO se

			cambia la temperatura de transporte de las muestras ($T \leq 8^{\circ}\text{C}$).
21/09/2018	300-03-10-23-1604	04	De acuerdo al Standard Method Ed. 23 de 2017 se procede a los siguientes ajustes: En la sección 7.1. Bandeja Multicelda de Colilert – se cambia la periodicidad del control de la bandeja multicelda de “por lote” a lo indicado en el método R-5.4-72 MÉTODO ANALÍTICO PRUEBA ENZIMA SUSTRATO PARA COLIFORMES TOTALES Y ESCHERICHIA COLI, SM 9223 B, 4c. VARIABLE MULTICELDA. En la sección 8. TOMA DE MUESTRA se anexa la implementación de la muestra viajera en los casos que transcurra un periodo mínimo de 3 a 4 horas entre la toma de la muestra y el ingreso de la muestra al laboratorio. Especificando además que ésta será analizada para la determinación de coliformes totales, E. coli y recuento de mesófilos. Esto obedece a la necesidad de controlar el proceso de toma de muestra. En la sección 12. Precisión del Método (Cartas de Control) se cambia la periodicidad de realización de duplicados de “por lote” a “la periodicidad establecida en cada método”. Además, se especifica que cuando $R_{\log} >$ criterio de precisión calculado de los 15 datos anteriores, se descarta el lote de muestras y se realiza un trabajo no conforme.
27/05/2019	300-03-10-23-0615	05	En el numeral 3 del presente documento se incluyen mecanismos de evaluación y seguimiento periódicos con el fin de verificar la adecuada aplicación de los procedimientos y la confiabilidad de los resultados analíticos.
19/11/2019	300-03-10-23-1429	06	En la sección 5.8- ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL se establecieron las condiciones y la periodicidad para realizar la verificación de esterilidad de los frascos de muestreo una vez pasados los lotes por el proceso de inertización por autoclavado. Además, se indica registro de dicha verificación en el formato “R- 6.3-04: CONTROL DE AUTOCLAVES”. En la sección 5.9 - CONTROL DE AGUA DE DILUCIÓN se establecieron las condiciones y la periodicidad para realizar la verificación de la calidad del agua usada en procesamientos y diluciones de muestras microbiológicas, de acuerdo al método de referencia 9020 C y D. se cambia la codificación del documento pasando de D-5.9-01 a D-7.7-01, al igual que la de los demás documentos, procedimientos y formatos referenciados en éste, de acuerdo a la nueva versión de la norma –ISO/IEC 17025:2017.
16/11/2021	300-03-10-23-2356	07	En el numeral 3 de este documento se dan las directrices para el seguimiento y desempeño del personal del laboratorio en el área de microbiología. El seguimiento de los analistas en microbiología se realizará semestralmente. En el numeral 7.3 se define un nuevo control de calidad para determinar la vida útil de la lámpara UV en la cabina de siembra.
26/05/2022	300-03-10-23-1320	08	En el numeral 7.5 Medios de cultivo y sustratos enzimáticos, se documenta la creación del registro R-7.4-41 CONTROL DE CALIDAD MEDIOS DE CULTIVO. En el numeral 10.4 Verificación viabilidad y pureza, se documenta que cuando un microorganismo ha cumplido su tiempo máximo de conservación y no se ha obtenido el nuevo lote del mismo, los analistas del área de microbiología, llevarán a cabo controles de calidad mensuales con el fin de garantizar que la cepa aun cumple con la viabilidad y pureza del mismo.
24/11/2023	300-03-10-23-2554	09	Se actualiza el documento d-7.7-01 CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLOGÍA, de acuerdo con la edición 24th del Standard Methods del 2022.
09/07/2025	100-03-10-23-1338	10	Se corrigió el año de publicación de la edición 24 de Standard Methods (2023).

Última línea-----última línea-----última línea