1. OBJETIVO

Validar los métodos de ensayos microbiológicos normalizados y/o no normalizados.

2. ALCANCE

Comprende desde la prevalidación de métodos de ensayo microbiológicos normalizados modificados y/o no normalizados hasta la revisión técnicas microbiológicas periódicas, incluyendo la validación de métodos de ensayo microbiológicos normalizados modificados y/o no normalizados y la actualización de validación de métodos de ensayo microbiológicos normalizados modificados y/o no normalizados por cambios o modificaciones aplicadas al método.

3. REFERENCIAS

- Guía Para la Acreditación de Laboratorios que Realizan Análisis Microbiológicos. ENAC (Entidad nacional de Acreditación). Rev.3.Noviembre 2001.
- "Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito", Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados, Segunda Edición, CENAM, noviembre de 2005.
- Validación de la Prueba de Coliformes Totales y Fecales por la Técnica de Tubos Múltiples Utilizando un Medio Fluorogénico. Tesis de grado. Universidad del Salvador. Mayo de 2008.
- Validación del Método de Detección de Coliformes Totales y Fecales en Agua Potable Utilizando Agar Chromocult. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de grado. Diciembre de 2008.

4. DEFINICIONES

Analito: se define como una lista de especies microbiológicas de interés definidas taxonómicamente.

Blanco: Es un sistema al que se le realiza el mismo tratamiento que a la muestra y se le adicionan los mismos reactivos, pero no contiene el analito de interés. Es decir que en lugar de muestra el blanco debe contener agua grado reactivo o agua destilada.

Cepas de Referencia: Microorganismos certificados obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida.

Especificidad: Fracción del número total de cultivos o colonias negativas que son asignados correctamente con el método utilizado. También puede definirse como la capacidad de un método de no detectar el microorganismo diana, si este no está presente.

$$Especificidad: \frac{VN}{VN + FP}$$

$VN: Verdaderos\ negativos.$

$FP: Falsos\ positivos.$

Exactitud: Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante el método y el valor verdadero. Para la determinación de la exactitud, se emplea la siguiente fórmula:

$$Error\ relativo\ porcentual = \frac{x_i - X}{X}\ 100$$

$X: Valor\ verdadero$

$xi: media\ de\ las\ medidas\ independientes\ realizadas$

Sensibilidad: 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.

$$Sensibilidad: \frac{VP}{VP + FP}$$

$VP: Verdaderos\ positivos$

$FP: Falsos\ positivos$

Límite de Cuantificación: Es el número mínimo de microorganismos dentro de una variabilidad definida que puede determinarse en las condiciones experimentales del método evaluado.
Límite de detección: Es el número mínimo de microorganismos que pueden ser detectados, pero en cantidades que no pueden estimarse con precisión.

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 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.

Muestra: Es todo sistema que sea sometido al procedimiento de análisis que se está evaluando.

Precisión: Es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. Es decir, mide que tan cerca se encuentran los resultados uno del otro.

$CV\ \ (\%): \frac{Sr}{\bar{y}}$ *100

$CV: coeficiente\ de\ variación\ para\ la\ reproducibilidad$

$S_r = desviación\ estandar\ de\ la\ repetibilidad$

$\bar{y} = promedio\ de\ los\ valores\ individuales$

Tasa de Falsos Positivos: La fracción de los positivos observados asignados erróneamente.

Tasa de Falsos Negativos: La fracción de los negativos observados asignados erróneamente.

Repetibilidad: Se refiere a la utilización de un procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo de tiempo corto realizado por el mismo analista, con el mismo equipo.

La repetibilidad de un método microbiológico se determina mediante el coeficiente de variación.
$CV_r(\%): \frac{Sr}{\bar{y}}$ *100

$CVr: coeficiente\ de\ variación\ para\ la\ repetibilidad$

$S_r = desviación\ estandar\ de\ la\ repetibilidad$

$\bar{y} = promedio\ de\ los\ valores\ individuales.$

Reproducibilidad: Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes. Su

ensayo debe estudiar las principales condiciones de variabilidad del método analítico: tiempo (días), analistas e instrumentos.
La reproducibilidad de un método microbiológico se determina mediante el coeficiente de variación.

$CV_R(\%): \frac{Sr}{\bar{y}}$ *100

$CVR: coeficiente\ de\ variación\ para\ la\ reproducibilidad.$

$S_r = desviación\ estandar\ de\ la\ repetibilidad.$

$\bar{y} = \ promedio\ de\ los\ valores\ individuales.$

Robustez: Es la insensibilidad de un método analítico a pequeños cambios en el procedimiento, la insensibilidad a lo largo del tiempo. Para examinar la robustez es aconsejable forzar las condiciones del método de un modo controlado.

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

5. DESARROLLO

Tabla 1. Validación de Métodos de Ensayo Microbiológicos Normalizados y/o No Normalizados

No.	Responsables	Descripción de la Actividad
01	**El (La) Responsable del Área y/o Analistas Delegados**	**Prevalidación de Métodos de Ensayo Microbiológicos Normalizados Modificados y/o No Normalizados** Prevalida el (los) método(s) de ensayo microbiológicos en el formato "R-7.2-05: PREVALIDACIÓN DE METODOS DE ENSAYO MICROBIOLÓGICOS NORMALIZADOS MODIFICADOS Y/O NO NORMALIZADOS". **Notas:** • La prevalidación del (los) método(s) de ensayo microbiológicos normalizados y/o no normalizados se realiza(n) en base en a La Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados, Segunda Edición, CENAM, Noviembre de 2005", La Guía para la Acreditación de laboratorios que realizan Análisis Microbiológicos, Tercera Versión, ENAC, Noviembre de 2002, El Proyecto de Validación de la Prueba de Coliformes Totales y Fecales por la Técnica de Tubos Múltiples Utilizando un Medio Fluorogénico. Tesis de Grado. Universidad del Salvador. Mayo de 2008, El Proyecto de Validación del Método de Detección de Coliformes Totales y Fecales en Agua Potable Utilizando Agar Chromocult. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Grado. Diciembre de 2008. • Los datos primarios de la prevalidación se registran en el formato "R-7.2-06: REGISTRO DE DATOS PRIMARIOS PREVALIDACIONES Y/O VALIDACIONES MICROBIOLÓGICOS". • Calibración Instrumental: Realizar tanto calibración como mantenimiento de los equipos del área según instrucciones del fabricante. Verificar el desempeño del instrumento según instrucciones del método, no mover los equipos del área de microbiología en harás de disminuir los posibles casos de contaminación cruzada.

No.	Responsables	Descripción de la Actividad
		• Materiales: Los materiales empleados para la validación provienen de proveedores certificados. Estos materiales pasaran por un control de calidad antes de ser usados para la validación. Para llevar a cabo el control de calidad se comparará el crecimiento o la inhibición de ciertos microorganismos blanco o no blanco en el medio de cultivo. • Control de esterilidad: Se realiza según lo estipulado en el documento "P-6.3-01 LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL LABORATORIO". • Condiciones Ambientales: El laboratorio controla las condiciones ambientales a través de la aplicación del procedimiento "P-6.3-03: CONTROL DE CONDICIONES AMBIENTALES". • Instalaciones: el laboratorio cuenta con las condiciones físicas necesarios para reducir al mínimo el riesgo de contaminación cruzada. • Higiene: La limpieza y desinfección del Laboratorio de Análisis de Aguas se realiza a través de la aplicación del procedimiento "P-6.3-01: LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUAS". • Antes de iniciar el proceso de validación se debe establecer (si aplica) por mediciones programadas: -Control de Calidad de los medios de cultivo de trabajo. -Límite de detección. -Límite de cuantificación. -Sensibilidad. -Especificidad. -Variables instrumentales o metodológicas particulares del laboratorio que puedan afectar el proceso de medición. • **Control de calidad de los medios de cultivo de trabajo:** Para llevar a cabo el control de calidad se comparará el crecimiento o la inhibición de ciertos microorganismos certificados blanco o no blanco para el medio de cultivo. Este ensayo se realizará por triplicado para cada microorganismo y será realizado por cada uno de los analistas responsables de la validación. • **Límite de detección:** Se determinará realizando diluciones con una concentración de $3x10^8$

No.	Responsables	Descripción de la Actividad
		UFC/mL (escala Mcfarland) del microorganismo de interés, de la cual se efectuará diluciones para determinar el nivel de inóculo más bajo que puede detectar el método. Este parámetro se evaluará diez veces para cada nivel de dilución de microorganismo por analista. Si el parámetro es medido por tubos de series de 5 se realizará por triplicado para obtener un total de 15 tubos inoculados con el microorganismo(s) de interés. • **Límite de cuantificación:** El límite de cuantificación, se determinará realizando diluciones desde una concentración de $3x10^8$ UFC/mL del microorganismo de interés, del cual se realizará diluciones para determinar el nivel de inóculo más bajo que puede ser cuantificado de una manera confiable mediante el método de análisis. Este parámetro se evaluará 10 veces para cada nivel de dilución de microorganismo por analista. • **Sensibilidad:** Muestras de agua serán inoculados con el (los) microorganismo (s) de interés, pertenecientes al género o especie que requiere(n) ser detectado(s). Este parámetro será analizado 10 veces por microorganismos por analista. • **Especificidad:** Serán inoculadas por separado muestras de agua con microorganismos no pertenecientes al género o especie(s) de interés, Este parámetro será analizado diez veces por microorganismo, por analista.
02	**El (La) Responsable del Área y/o Analistas Delegados**	**Validación de Métodos de Ensayo Microbiológicos Normalizados Modificados y/o No Normalizados** Valida el (los) método(s) de ensayo en el formato "R-7.2-07: VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO MICROBIOLÓGICOS NORMALIZADOS MODIFICADOS Y/O NO NORMALIZADOS". **Nota:** • La validación del (los) método(s) de ensayo microbiológicos normalizados y/o no normalizados se referencian en base a La Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados, Segunda Edición, CENAM, Noviembre de 2005", La Guía para la Acreditación de Laboratorios que Realizan Análisis Microbiológicos, Tercera Versión, ENAC,

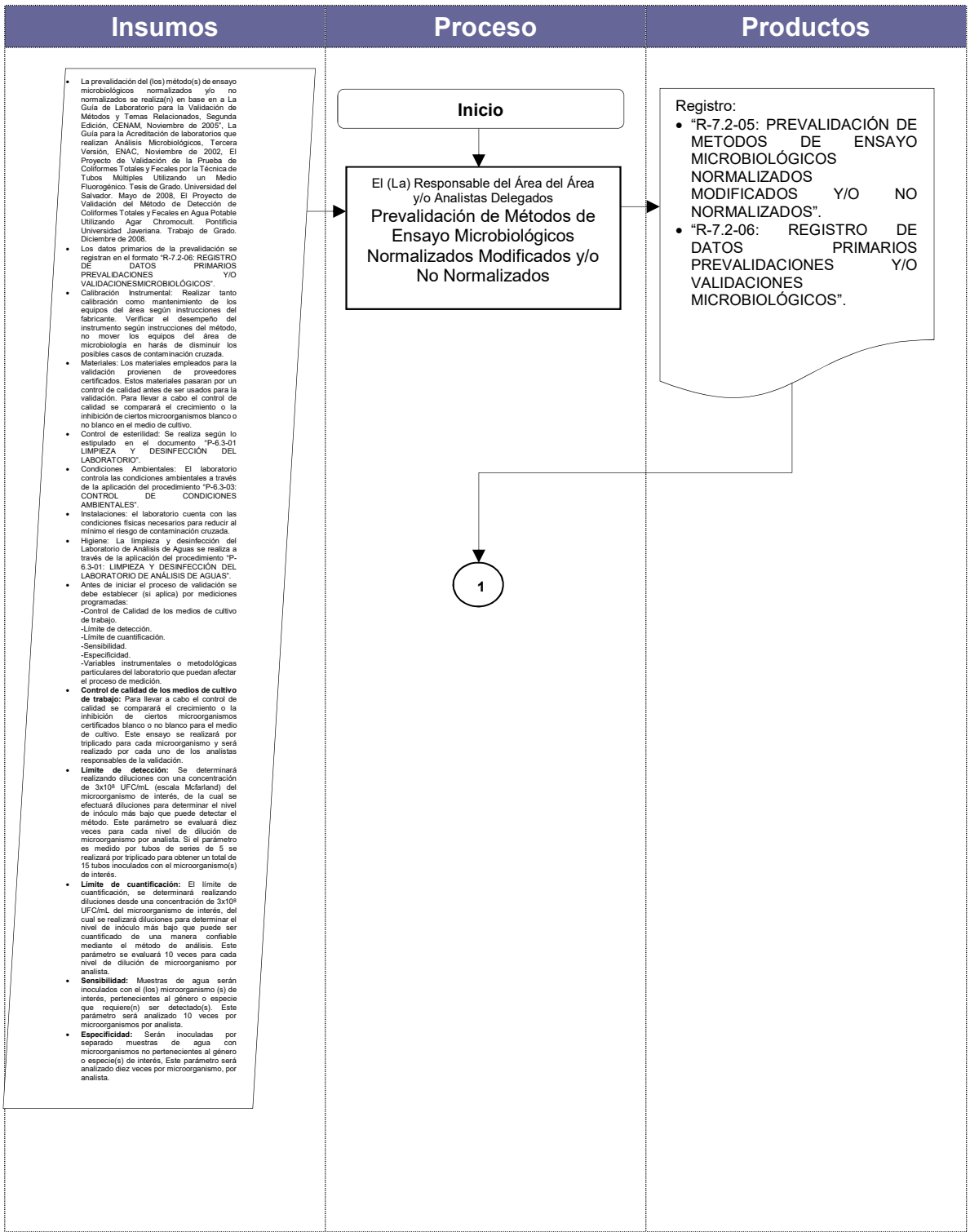
No.	Responsables	Descripción de la Actividad
		Noviembre de 2002, El Proyecto de Validación de la Prueba de Coliformes Totales y Fecales por la Técnica de Tubos Múltiples Utilizando un Medio Fluorogénico. Tesis de Grado. Universidad del Salvador. Mayo de 2008, El Proyecto de Validación del Método de Detección de Coliformes Totales y Fecales en Agua Potable Utilizando Agar Chromocult. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Grado. Diciembre de 2008. • Los datos primarios de validación se registran en el formato "R-7.2-06: REGISTRO DE DATOS PRIMARIOS PREVALIDACIONES Y/O VALIDACIONES MICROBIOLÓGICOS". • Para la evaluación de la precisión, exactitud, robustez, se realizara 10 ensayos por duplicado por analista (cuando aplique), que contengan: control positivo, blanco, límite de cuantificación o detección, muestras de matrices inoculadas a evaluar. • Cada serie de muestras se realizará el mismo día corriendo todas las muestras de forma paralela. El procedimiento no superará los 10 días, ni tendrá espacios de más de 3 días entre ensayo. • Los procedimientos se iniciarán a la misma hora, lo suficientemente temprano para que se pueda cumplir con el análisis de todas las muestras, teniendo en cuenta que pueden ocurrir imprevistos. • Todo el material de microbiología, debe ser lavado previamente de acuerdo con el procedimiento "P-6.3-01 LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL LABORATORIO" establecido por el laboratorio, ser esterilizado con antelación y ser sometido a control de calidad correspondiente. • Los equipos y zonas de laboratorio, así como la cabina de flujo laminar, deben ser desinfectados, como es establecido en el formato "P-6.3-01 LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL LABORATORIO". • La validación de los métodos de microbiología se efectuarán con mínimo 2 analistas. • **Precisión:** Calcular la desviación (es) estándar y el coeficiente de variación (CV) para cada "muestra" tomando todos los datos de los ensayos montados por día.

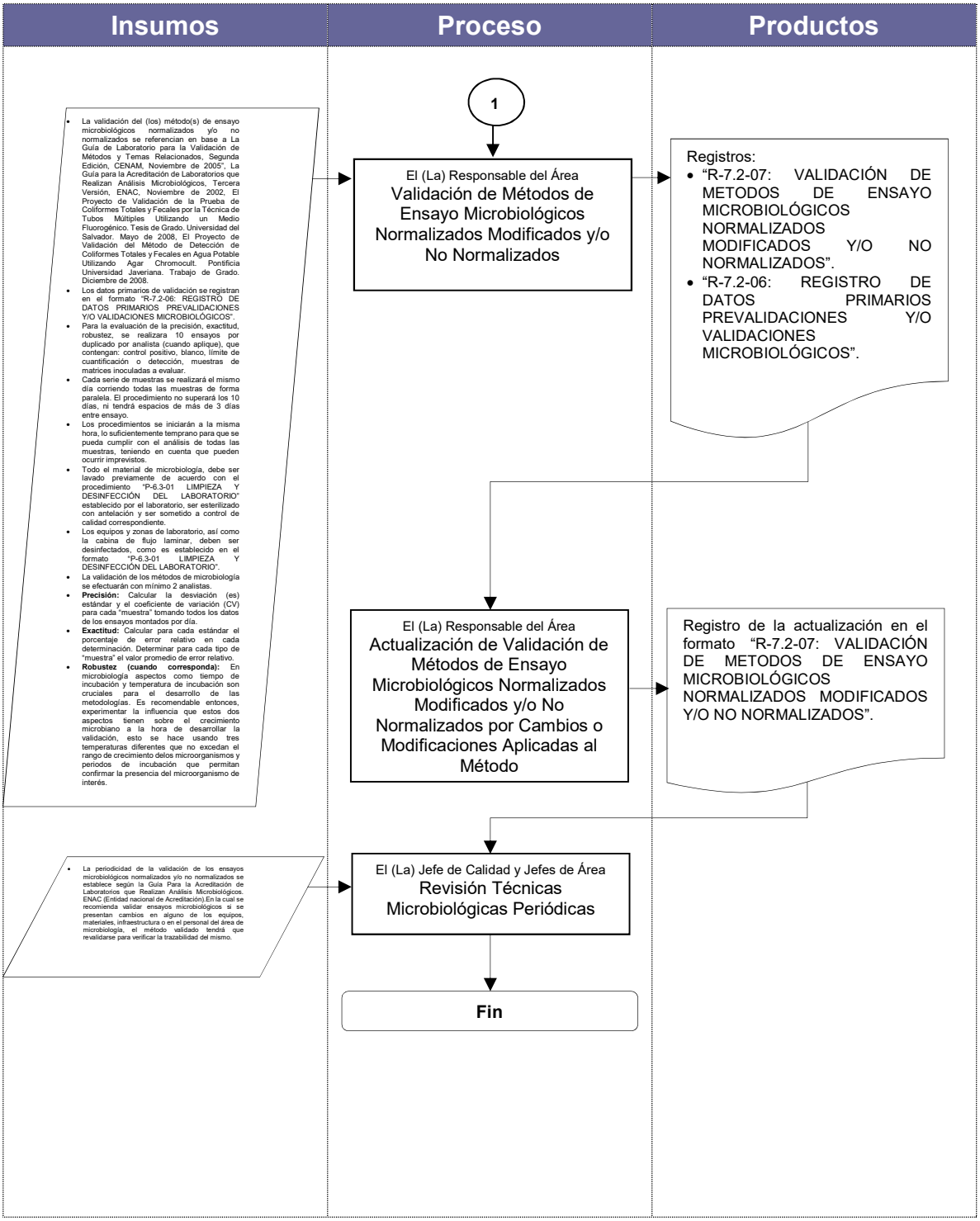
No.	Responsables	Descripción de la Actividad
		• **Exactitud:** Calcular para cada estándar el porcentaje de error relativo en cada determinación. Determinar para cada tipo de "muestra" el valor promedio de error relativo. • **Robustez (cuando corresponda):** En microbiología aspectos como tiempo de incubación y temperatura de incubación son cruciales para el desarrollo de las metodologías. Es recomendable entonces, experimentar la influencia que estos dos aspectos tienen sobre el crecimiento microbiano a la hora de desarrollar la validación, esto se hace usando tres temperaturas diferentes que no excedan el rango de crecimiento delos microorganismos y periodos de incubación que permitan confirmar la presencia del microorganismo de interés.
03	**El (La) Responsable del Área**	**Actualización de Validación de Métodos de Ensayo Microbiológicos Normalizados Modificados y/o No Normalizados por Cambios o Modificaciones Aplicadas al Método.** Actualiza la Validación de Métodos de Ensayo Microbiológicos Normalizados Modificados y/o No Normalizados por cambios o modificaciones aplicadas al método. **Nota:** • El registro de la actualización se realiza en el formato "R-7.2-07: VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO MICROBIOLÓGICOS NORMALIZADOS MODIFICADOS Y/O NO NORMALIZADOS".

No.	Responsables	Descripción de la Actividad
04	**El (La) Jefe de Calidad y Jefes de Área**	**Revisión Técnicas Microbiológicas Periódicas** Revisa la validez de las técnicas microbiológicas desarrolladas en el laboratorio de aguas. **Nota:** • La periodicidad de la validación de los ensayos microbiológicos normalizados y/o no normalizados se establece según la Guía Para la Acreditación de Laboratorios que Realizan Análisis Microbiológicos. ENAC (Entidad nacional de Acreditación). En la cual se recomienda validar ensayos microbiológicos si se presentan cambios en alguno de los equipos, materiales, infraestructura o en el personal del área de microbiología, el método validado tendrá que revalidarse para verificar la trazabilidad del mismo.

6. FLUJOGRAMA

Tabla 2. Flujograma de la Validación de Métodos de Ensayo Microbiológicos Normalizados y/o No Normalizados




Insumos
Proceso
Productos
1
La validación del (los) método(s) de ensayo microbiológicos normalizados y/o no normalizados se referencian en base a La Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados, Segunda Edición, CENAM, Noviembre de 2005", La Guía para la Acreditación de Laboratorios que Realizan Análisis Microbiológicos, Tercera Versión, ENAC, Noviembre de 2002, El Proyecto de Validación de la Prueba de Coliformes Totales y Fecales por la Técnica de Tubos Múltiples Utilizando un Medio Fluorogénico. Tesis de Grado. Universidad del Salvador. Mayo de 2008, El Proyecto de Validación del Método de Detección de Coliformes Totales y Fecales en Agua Potable Utilizando Agar Chromocult. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Grado. Diciembre de 2008.
Los datos primarios de validación se registran en el formato "R-7.2-06: REGISTRO DE DATOS PRIMARIOS PREVALIDACIONES Y/O VALIDACIONES MICROBIOLÓGICOS".
Para la evaluación de la precisión, exactitud, robustez, se realizara 10 ensayos por duplicado por analista (cuando aplique), que contengan: control positivo, blanco, límite de cuantificación o detección, muestras de matrices inoculadas a evaluar.
Cada serie de muestras se realizará el mismo día corriendo todas las muestras de forma paralela. El procedimiento no superará los 10 días, ni tendrá espacios de más de 3 días entre ensayo.
Los procedimientos se iniciarán a la misma hora, lo suficientemente temprano para que se pueda cumplir con el análisis de todas las muestras, teniendo en cuenta que pueden ocurrir imprevistos.
Todo el material de microbiología, debe ser lavado previamente de acuerdo con el procedimiento "P-6.3-01 LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL LABORATORIO" establecido por el laboratorio, ser esterilizado con antelación y ser sometido a control de calidad correspondiente.
Los equipos y zonas de laboratorio, así como la cabina de flujo laminar, deben ser desinfectados, como es establecido en el formato "P-6.3-01 LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL LABORATORIO".
La validación de los métodos de microbiología se efectuarán con mínimo 2 analistas.
Precisión: Calcular la desviación (es) estándar y el coeficiente de variación (CV) para cada "muestra" tomando todos los datos de los ensayos montados por día.
Exactitud: Calcular para cada estándar el porcentaje de error relativo en cada determinación. Determinar para cada tipo de "muestra" el valor promedio de error relativo.
Robustez (cuando corresponda): En microbiología aspectos como tiempo de incubación y temperatura de incubación son cruciales para el desarrollo de las metodologías. Es recomendable entonces, experimentar la influencia que estos dos aspectos tienen sobre el crecimiento microbiano a la hora de desarrollar la validación, esto se hace usando tres temperaturas diferentes que no excedan el rango de crecimiento delos microorganismos y periodos de incubación que permitan confirmar la presencia del microorganismo de interés.
El (La) Responsable del Área
Validación de Métodos de Ensayo Microbiológicos Normalizados Modificados y/o No Normalizados
Registros:
"R-7.2-07: VALIDACIÓN DE METODOS DE ENSAYO MICROBIOLÓGICOS NORMALIZADOS MODIFICADOS Y/O NO NORMALIZADOS".
"R-7.2-06: REGISTRO DE DATOS PRIMARIOS PREVALIDACIONES Y/O VALIDACIONES MICROBIOLÓGICOS".
El (La) Responsable del Área
Actualización de Validación de Métodos de Ensayo Microbiológicos Normalizados Modificados y/o No Normalizados por Cambios o Modificaciones Aplicadas al Método
Registro de la actualización en el formato "R-7.2-07: VALIDACIÓN DE METODOS DE ENSAYO MICROBIOLÓGICOS NORMALIZADOS MODIFICADOS Y/O NO NORMALIZADOS".
La periodicidad de la validación de los ensayos microbiológicos normalizados y/o no normalizados se establece según la Guía Para la Acreditación de Laboratorios que Realizan Análisis Microbiológicos. ENAC (Entidad nacional de Acreditación).En la cual se recomienda validar ensayos microbiológicos si se presentan cambios en alguno de los equipos, materiales, infraestructura o en el personal del área de microbiología, el método validado tendrá que revalidarse para verificar la trazabilidad del mismo.
El (La) Jefe de Calidad y Jefes de Área
Revisión Técnicas Microbiológicas Periódicas
Fin

7. REGISTROS

Identificación		Almacenamiento, Protección y Recuperación		Acceso	Retención	Disposición Final
COD	**Nombre**	**Ubicación**	**Clasificación**	**Personal Autorizado**	**Tiempo**	**Método**
R-7.2-05	PREVALIDACIÓN DE METODOS DE ENSAYO MICROBIOLÓGICOS NORMALIZADOS MODIFICADOS Y/O NO NORMALIZADOS	Carpeta en las instalaciones del Laboratorio de Análisis Aguas.	Número y Nombre	Líderes de Proceso o funcionarios autorizados por ellos. Auditores Internos.	2 años	Archivo Central
R-7.2-06	REGISTRO DE DATOS PRIMARIOS PREVALIDACIONES Y/O VALIDACIONESMICROBIOLÓGICOS	Carpeta en las instalaciones del Laboratorio de Análisis Aguas.	Número y Nombre	Líderes de Proceso o funcionarios autorizados por ellos. Auditores Internos.	2 años	Archivo Central
R-7.2-07	VALIDACIÓN DE METODOS DE ENSAYO MICROBIOLÓGICOS NORMALIZADOS MODIFICADOS Y/O NO NORMALIZADOS	Carpeta en las instalaciones del Laboratorio de Análisis Aguas.	Número y Nombre	Líderes de Proceso o funcionarios autorizados por ellos. Auditores Internos.	2 años	Archivo Central

8. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha	Resolución	Versión	Detalle
12/12/2014	300-03-10-23-1864	01	Aprobación inicial con código y nombre P-5.4-04: VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO MICROBIOLÓGICOS NORMALIZADOS Y/O NO NORMALIZADOS.
05/10/2016	300-03-10-23-1303	02	Se actualiza el logo corporativo.
19/11/2019	300-03-10-23-1429	03	Se cambia la codificación del procedimiento pasando de P-5.4-04 a P-7.2-04 de acuerdo a la nueva versión de la Norma – ISO/IEC 17025:2017, así como también se modifican los demás procedimientos y registros referenciados en éste.
09/07/2025	100-03-10-23-1338	04	Se actualiza el encabezado debido al cambio de subdirección.

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