

Importancia de un protocolo de verificación de métodos microbiológicos según requisitos de la ISO/IEC 17025:2017

Roberth Eduardo Cárdenas Chiquillo



Universidad de Antioquía

Programa de Especialización en Gestión y Aseguramiento de la Calidad en Laboratorios Clínico y de Ensayo

Escuela de Microbiología

Medellín, Colombia

2024

Importancia de un protocolo de verificación de métodos microbiológicos según requisitos de la ISO/IEC 17025:2017

Roberth Eduardo Cárdenas Chiquillo

Asesor:

Natalia Andrea Gómez Grimaldos

Trabajo de grado para optar el título de especialista en Gestión y Aseguramiento de la Calidad en Laboratorios Clínico y de Ensayo

Universidad de Antioquía

Programa de Especialización en Gestión y Aseguramiento de la Calidad en Laboratorios Clínico y de Ensayo

Escuela de Microbiología

Medellín, Colombia

2024

FIRMA DE APROBACIÓN DE LA MONOGRAFÍA

Gómez Grimaldos Nathalia Andrea

Medellín, Colombia 2024

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres y hermano, sin su acompañamiento, mensajes de aliento y abrazos fraternales, nada de lo que he conseguido hasta hoy hubiese sido posible.

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeras de especialización y amigos más allegados que la vida me ha regalado, gracias por ser pilares importantes en este proceso de aprendizaje, su acompañamiento ha sido fundamental para el logro de esta meta.

A mi asesora en este trabajo monográfico, gracias por su acompañamiento en este proceso que no ha sido fácil, pero que gracias a su orientación he podido culminar esta etapa.

INDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 2 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 5 |
| 4. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS..... | 8 |
| 4.1. Objetivo General..... | 8 |
| 4.2. Objetivos Específicos. | 8 |
| 5. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL..... | 9 |
| 6. METODOLOGÍA | 13 |
| 7. RESULTADOS | 14 |
| <i>-Fase preanalítica a la verificación y/o validación de métodos analíticos:</i> | 17 |
| <i>-Fase analítica en la verificación y/o validación de métodos analíticos:</i> | 21 |
| <i>-Fase postanalítica en la verificación y/o validación de métodos analíticos:</i> | 28 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 34 |
| 9. RECOMENDACIONES | 38 |
| 10. CONCLUSIONES | 39 |
| 11. ANEXOS..... | 40 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA..... | 41 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Diferencias en las definiciones de concepto de verificación y validación según la ISO 9000, ISO/IEC 17025:2017 y VIM..... | 14 |
| Tabla 2. Validación en un solo laboratorio con enfoque convencional-parámetros de desempeño recomendados para la verificación de métodos..... | 20 |
| Tabla 3. Protocolos recomendados para determinar el eLOD50 según la ISO 16140-3. | 23 |
| Tabla 4. Documentos oficiales a nivel nacional e internacional relacionados con la verificación y/o validación de métodos analíticos..... | 37 |

INDICE DE FÍGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Relación entre el proceso de verificación/validación de los métodos analíticos y la norma ISO/IEC 17025:2017..... | 7 |
| Figura 2. Pasos a seguir para el proceso de validación o verificación de métodos analíticos. | 16 |
| Figura 3. Aspectos a tener en cuenta para minimizar los errores sistemáticos y aleatorios..... | 17 |
| Figura 4. ISO 16140. Diagrama para la selección del protocolo de evaluación del desempeño a realizar. | 21 |
| Figura 5. Proceso para determinación SIR de un alimento en un laboratorio. | 25 |
| Figura 6. Modelo experimental propuesta por etapas. | 27 |

1.INTRODUCCIÓN

La ejecución de ensayos microbiológicos, esenciales en diversas industrias, requiere de métodos variados que pueden incluir desde técnicas convencionales hasta alternativas más modernas, abarcando aspectos como cultivo, microscopía, técnicas moleculares e inmunoenzimáticas, entre otras. Estos métodos, no siendo determinantes por sí solos, se combinan para tomar decisiones acertadas en la entrega de resultados. La calidad de estos resultados, esencial para la seguridad alimentaria y la salud pública, está respaldada por el cumplimiento de requisitos técnicos, legales y normativos, garantizando su fiabilidad y trazabilidad mediante sistemas de gestión de calidad.

La complejidad inherente a los métodos microbiológicos, derivada de la diversidad de microorganismos y sus requisitos específicos de cultivo e identificación, dificulta la creación de protocolos generales aplicables a todos los casos. Además, la ausencia de protocolos estandarizados para la verificación de métodos en microbiología agrava este desafío. La norma ISO/IEC 17025:2017 destaca la importancia de la verificación para validar los resultados de laboratorio, fortaleciendo la confianza tanto de los clientes como de las autoridades reguladoras.

Con el propósito de abordar esta necesidad, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica exhaustiva, consultando fuentes reconocidas internacionalmente como Springer, Elsevier, PubMed y Google Scholar. Esta búsqueda dio lugar a la creación de una guía práctica para la verificación y/o validación de métodos microbiológicos aplicados en alimentos, estructurada en tres etapas fundamentales del proceso analítico: preanalítica, analítica y postanalítica.

La guía propuesta no solo ofrece una planificación detallada, sino también un enfoque holístico que abarca todas las etapas del proceso. Esto asegura una ejecución efectiva y eficiente del estudio de verificación y/o validación, siendo una herramienta valiosa para los laboratorios de la industria alimentaria en su búsqueda por mantener altos estándares de calidad y seguridad.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La vida diaria está intrínsecamente relacionada con los microorganismos y estos afectan todos los aspectos de nuestras vidas siendo catalogados como omnipresentes, es decir, están en nosotros, sobre nosotros y alrededor de nosotros, es por ello, que la microbiología como disciplina ha cobrado una gran importancia y ha sido aplicada en diversos campos, que van desde los aportes a la salud humana en la ciencia de la medicina, la producción de alimentos inocuos, el monitoreo de la calidad del agua y del aire, el estudio de las ciencias forenses, la biotecnología y el desarrollo científico a través de actividades de investigación que contribuye de manera significativa en la búsqueda de tecnologías sostenibles y el mejoramiento de la calidad de vida (Tyurina et al., 2020).

Los métodos de ensayo microbiológicos pueden incluir metodologías convencionales, rápidas o alternativas y pueden estar basados en técnicas de cultivo, de microscopía, moleculares, inmunoenzimáticas, por citometría o por técnicas de identificación tales como criterios morfológicos, tinción diferencial, tipificación, ensayos serológicos, pruebas bioquímicas o en detección molecular, los cuales no son determinantes, y por lo tanto, se usan en combinación de más de uno, para poder tomar un criterio de decisión para dar un resultado (Gavin, 1959). De manera general, los métodos de ensayo pueden dividirse en métodos cualitativos, cuya respuesta va a depender de la concentración (mínima) del analito y el resultado final, es la presencia o ausencia del analito, detectado directa o indirectamente en una determinada cantidad de muestra (por encima de un valor umbral definido por el propio método), generalmente 25 g (que en unidad de volumen, es equivalente a mL), y por otro lado están los métodos cuantitativos cuyo resultado es conocer la cantidad de analito medido, directa o indirectamente, en una determinada cantidad de muestra (Feldstein et al., 2002).

Ahora bien, los parámetros de desempeño son diferentes para cada uno de los métodos, es decir, en los métodos cualitativos se tienen en cuenta conceptos como límite de detección, sensibilidad y especificidad, ya en los cuantitativos parámetros como repetibilidad, reproducibilidad, sesgo, recuperación y robustez, los cuales están relacionados directamente en términos de linealidad, veracidad y precisión, que a su vez permiten identificar errores de tipo sistemáticos o aleatorios en los métodos (Pum, 2019). Por tanto, y en función de esto, los microbiólogos deben asegurar la fiabilidad de los resultados, lo que conlleva que además de reunir los criterios técnicos que aseguren su validez, estos deben ser realizados con una serie de actividades técnicas, que permitan obtener

resultados comparables, con independencia del laboratorio que los ejecute. En este sentido, el empleo de métodos de referencia, reconocidos y aceptados, es la herramienta más eficaz para obtener estas garantías (Camaró-Sala et al., 2015).

La capacidad técnica en la ejecución de los ensayos debe asegurar la confiabilidad de los resultados, a través del cumplimiento de una serie de requisitos técnicos, legales y normativos, que permitan entregar resultados fiables y trazables; de acuerdo y bajo un sistema de gestión de calidad (Delgado & Salazar Casco, 2023). A partir de la publicación de la norma ISO/IEC 17025:2017, la validación y la verificación de los métodos microbiológicos cobra un papel fundamental, en tanto que el trabajo de los laboratorios se centra en demostrar, de manera objetiva, frente a los organismos que otorgan reconocimiento y acreditación, que el método o el sistema de medición seleccionado cumple los parámetros de desempeño establecidos y que el laboratorio es competente para ejecutarlo (INM, 2023). Sin embargo, actualmente la falta de protocolos de verificación estandarizados y rigurosos puede comprometer la calidad y confiabilidad de los datos obtenidos (Camaró-Sala et al., 2015).

En la microbiología, la identificación y caracterización de microorganismos, así como la evaluación de su sensibilidad a los antimicrobianos, son procesos críticos que pueden influir en decisiones médicas, agrícolas y de seguridad alimentaria. La ausencia de protocolos de verificación adecuados puede conducir a errores de interpretación, resultados inconsistentes, a tratamientos o soluciones equivocadas y, en última instancia, a consecuencias negativas para la salud pública y la seguridad alimentaria (Camaró-Sala et al., 2015). Además, la falta de protocolos de verificación puede obstaculizar la reproducibilidad y comparabilidad de los resultados entre diferentes laboratorios e investigadores (Paisan & Moret, 2010), lo cual puede dificultar la validación de hallazgos analíticos científicos, además de la implementación de políticas basadas en evidencia y el avance de la investigación en el área de la microbiología. Por lo tanto, el establecimiento de protocolos robustos de verificación en microbiología, es esencial para garantizar la calidad y confiabilidad de los resultados, así como también para fortalecer la reproducibilidad y comparabilidad de los mismos. Esto requerirá un enfoque colaborativo entre investigadores, instituciones académicas, agencias reguladoras y la industria, aunando esfuerzos para desarrollar y adoptar estándares o estrategias que permitan, demostrar la capacidad técnica entre laboratorios, así como mejores prácticas en el campo de la microbiología (Ortega González et al., 2013).

Así mismo, adicional a la ausencia de protocolos para la verificación de métodos en microbiología, es importante mencionar otros aspectos importantes tales como la complejidad de los métodos, ya que estos suelen ser más complejos que los utilizados en otras disciplinas científicas debido a la naturaleza misma de los microorganismos, expresados en una enorme variedad de especies con requisitos específicos de cultivo, identificación y análisis. Esto sin duda alguna puede dificultar la creación de protocolos generales que se apliquen a todos los tipos de microorganismos (Guglielmone et al., 2011).

Además, la complejidad de la naturaleza de la matriz de análisis, por su variabilidad, más que los métodos, puede dificultar la normalización, la armonización y verificación de los métodos, los cuales también están en constante evolución, con nuevos métodos y tecnologías emergentes (Oteo et al., 2017). Esto puede dificultar la creación de protocolos estandarizados que se mantengan vigentes con los avances en el área de la microbiología, sumado a que el ejercicio de la validación y verificación de métodos en microbiología pueden requerir una inversión significativa de recursos, que incluye tiempo, personal competente, equipos especializados, materiales e insumos de laboratorio. Esto puede limitar la capacidad de los investigadores y laboratorios para llevar a cabo estrategias de verificación analítica (Ortega González et al., 2013).

En Colombia, la NTC-ISO/IEC 17025:2017 define los requisitos que los laboratorios de ensayo y calibración deben cumplir para demostrar su competencia y capacidad de generar resultados técnicamente válidos; el entendimiento y la interpretación de esta norma, es crucial y clara en lo referente a que el laboratorio debe verificar sus métodos, es decir, aportar evidencia objetiva que un elemento dado satisface los requisitos especificados, por tanto, el laboratorio debe llevar a cabo apropiadamente los métodos antes de ser utilizados, asegurando que se logra el desempeño requerido (ISO/IEC 17025:2017 Numeral 7.2.1.5).

3. JUSTIFICACIÓN

En el ámbito de los laboratorios microbiológicos, la calidad y fiabilidad de los resultados son dos temas que están estrechamente relacionados y son de suma importancia (Wallace & MacKay, 2013). Estos resultados son a su vez considerados críticos ya que influyen en la toma de decisiones en la industria alimentaria, farmacéutica y en salud pública, entre otras (OPS, 2021). Para asegurar la precisión de estos resultados, es esencial seguir estándares reconocidos internacionalmente, como la norma ISO/IEC 17025:2017, que establece los requisitos para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

La verificación de métodos microbiológicos según los requisitos de la norma ISO/IEC 17025:2017 es fundamental para garantizar la validez y confiabilidad de los resultados obtenidos en los laboratorios. La implementación adecuada de un protocolo de verificación, no solo asegura la calidad de los datos generados, sino que también fortalece la confianza en la precisión de los resultados por parte de los clientes y las autoridades reguladoras (FAO, 2013).

Por tanto, los errores en los resultados microbiológicos pueden tener consecuencias graves (Onís González et al., 2017). En la industria alimentaria, por ejemplo, la detección incorrecta de patógenos puede llevar a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, afectando la reputación de una empresa y poniendo en riesgo la salud pública (OPS, 2021). En el ámbito de la salud, resultados erróneos pueden llevar a diagnósticos incorrectos y tratamientos inadecuados para los pacientes (Onís González et al., 2017).

Sin embargo, a pesar de la existencia de la norma ISO/IEC 17025:2017, muchos laboratorios aún enfrentan desafíos en la implementación efectiva de un protocolo de verificación de métodos microbiológicos, por lo tanto, es importante entender la diferencia entre la norma ISO/IEC 17025:2017 y los procesos de verificación o validación de métodos analíticos en el ámbito de los laboratorios y la calidad de los análisis que realizan. La norma ISO/IEC 17025:2017 se enfoca en la competencia técnica y la gestión de la calidad de los laboratorios, y su estructura normativa abarca diferentes requisitos divididos en generales, relativos a la estructura, relativos a los recursos y del proceso, estos últimos son los que exclusivamente hacen mención al proceso de selección, verificación y validación de métodos analíticos, dando a conocer las pautas de cuándo un método analítico se debe verificar y/o cuando se debe validar (Ver figura 1), pero es importante dar claridad

que al momento de verificar y/o validar un método analítico no necesariamente estamos cumpliendo con todos lo establecidos en la norma ISO/IEC 17025:2017, solamente con el ítem 7.2; es decir, un laboratorio por pequeño, mediano o grande que puede estar verificando y/o validando sus métodos no necesariamente debe estar acreditado según la norma ISO/IEC 17025:2017. Esto puede deberse a una falta de comprensión completa de los requisitos, recursos limitados, o simplemente a una falta de conciencia sobre la importancia de los procesos de aseguramiento de la calidad de acuerdo con las normas ISO (Oliver., 2018).

Es imperativo que los laboratorios microbiológicos reconozcan la importancia de implementar un protocolo de verificación de métodos de acuerdo con la norma ISO/IEC 17025:2017. Esto no solo garantiza la calidad de los resultados, sino que también mejora los procesos, la credibilidad y reputación del laboratorio, promoviendo así la confianza tanto interna como externa en sus servicios (Prieto et al., 2017).

Entre las barreras para la implementación efectiva se encuentran la falta de capacitación adecuada del personal, la escasez de recursos financieros y de tiempo, así como la complejidad de algunos métodos microbiológicos que dificultan su verificación (Ortiz, G.E., 2015). Es claro que la importancia de un protocolo de verificación de métodos radica en la identificación y corrección de posibles errores o sesgos en los métodos microbiológicos utilizados, ya que se tienen en cuenta la evaluación de la precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad de los métodos, lo que contribuye a la minimización de resultados incorrectos o interpretaciones erróneas (Honsa & McIntyre, 2003).

En resumen, una guía de protocolo de verificación de métodos microbiológicos es esencial para asegurar la calidad, validez y confiabilidad de los resultados obtenidos en los análisis, además de que contribuye al cumplimiento de la norma ISO/IEC 17025:2017, prevención de errores, mejora continua, confianza del cliente y usuarios finales, así como al desarrollo científico, la reducción de riesgos y costos asociados. Por tanto, con el presente trabajo monográfico se busca generar una base sólida respaldada por estudios y artículos académicos que resalten la importancia de un protocolo de verificación de métodos microbiológicos según los requisitos de la ISO/IEC 17025:2017 para garantizar la excelencia en los análisis y la protección de la salud pública.

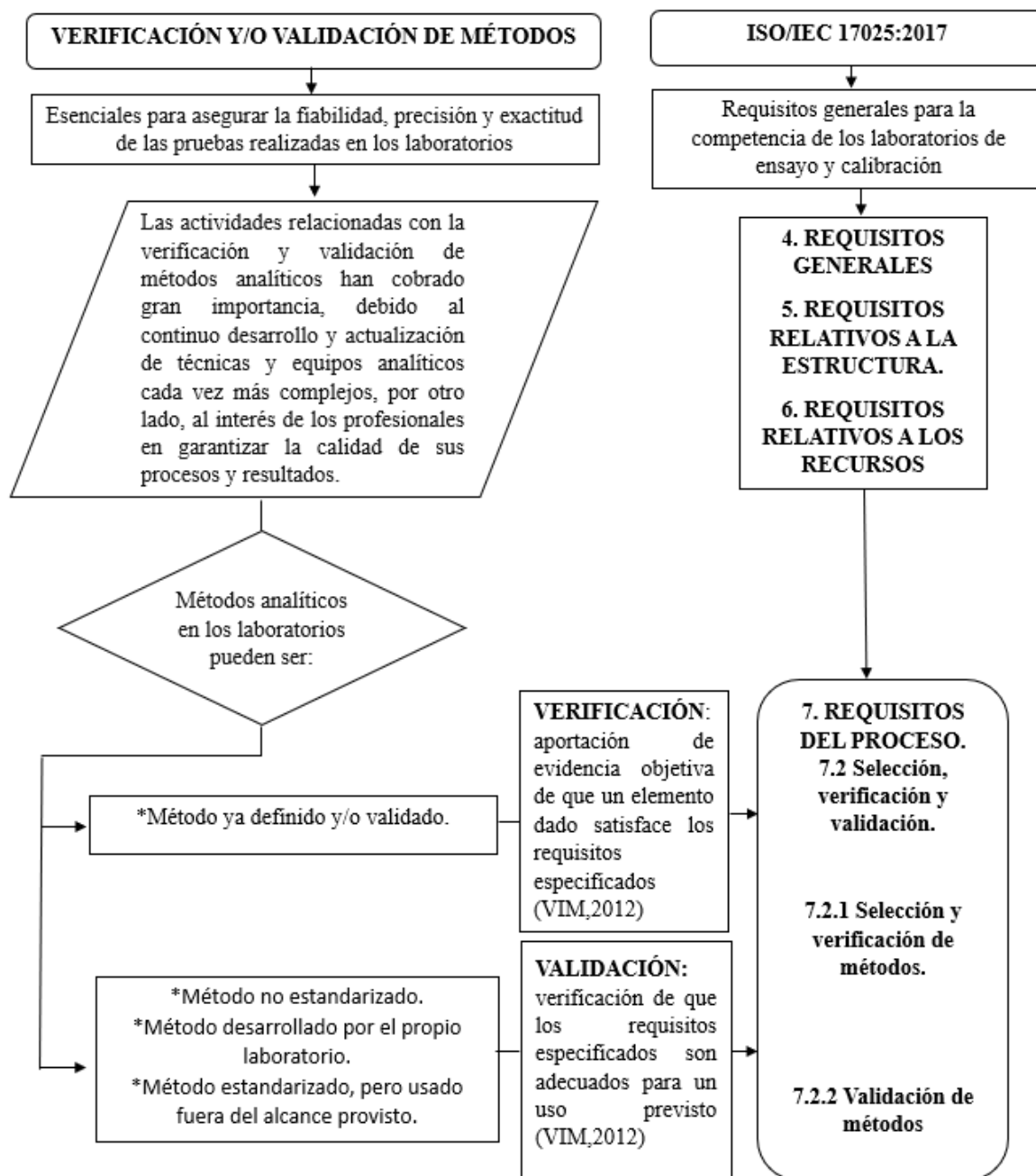


Figura 1. Relación entre el proceso de verificación/validación de los métodos analíticos y la norma ISO/IEC 17025:2017.

4. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS.

4.1. Objetivo General.

- Establecer una guía de verificación de métodos microbiológicos a través de una búsqueda bibliográfica teniendo en cuenta la variedad de especies microbianas y comportamiento microbiológico.

4.2. Objetivos Específicos.

- Sintetizar la importancia de desarrollar protocolos de verificación de métodos microbiológicos de acuerdo con la variedad de especies microbianas.
- Profundizar en la importancia de fortalecer la búsqueda de estrategias metodológicas para la verificación de métodos microbiológicos.
- Orientar una búsqueda bibliográfica en términos de metodologías, que permita la homogeneización para la verificación de acuerdo a la variedad de especies y su comportamiento microbiológico.

5. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL

Los microorganismos siempre han sido de gran importancia y aunque inicialmente su estudio estuvo relacionado principalmente al área clínica como responsables de una alta morbilidad y mortalidad a lo largo de la historia (Christoffersen, 2015), actualmente el interés de conocer a profundidad su interacción ha llevado a entender la importancia del papel de los microorganismos con el medio ambiente, la salud pública y los procesos industriales (Montaño et al., 2010; Ostos Ortíz et al., 2019). A través de los métodos de ensayos microbiológicos, se obtiene información crucial en temas clínicos, industriales y ambientales, estos resultados tienen un impacto decisivo en áreas como el diagnóstico clínico, la salud pública, la tecnología alimentaria y el medio ambiente (INM,2023).

Antes de la segunda guerra mundial en Japón los procesos industriales estaban enfocados en producir masivamente un bien o un servicio sin contemplar la calidad en sus procesos, es decir, más cantidad al menor tiempo posible, que desencadenó en una mala calidad de los productos y servicios (Luis Herrera & Campos, 2007), pero después de la segunda guerra mundial se generó un cambio significativo en los conceptos aplicados para la producción mundial, dado que los japoneses planeaban la forma de reconstruir su país tras quedar totalmente derrotado, por tanto, los industriales, profesionales y técnicos japoneses estaban dispuestos a trabajar con el fin de recuperar la economía japonesa (Ojeda & Lozada, 2000). Es allí donde este país puso atención al Dr. Deming, el cual promulgaba el hecho de que el modelo de supervisión no funcionaba y que lo que había que hacer era pasar a un principio de prevención, por lo que se creó el concepto de "trabajar con calidad" basado en que en lugar de intentar culpar y controlar, se trata de educar, informar y apoyar al trabajador (García P. et al., 2014).

Además, con el pasar de los años, dada las malas conductas científicas en el año 1978 se crean las buenas prácticas de laboratorio (BPL) como una respuesta de la FDA (Food and Drug Administration, administración de alimentos y fármacos de los EEUU) ante este fenómeno que estaba afectando los ensayos de laboratorios y gracias a su creación permitió su expansión en varios países y regiones del mundo promoviendo así el concepto de estándares internacionales (OECD, 1981). Así fue como las normas sobre buenas prácticas de laboratorio (BPL) pasaron a formar parte

del panorama regulatorio a finales de la década de 1970 en respuesta a las malas prácticas en las actividades de investigación y desarrollo (I+D) por parte de las empresas farmacéuticas y las instalaciones contratadas que utilizaban (OMS,2010).

Históricamente, cuando se habla de la ISO/IEC 17025:2017 se debe recordar que sus inicios empezaron con la Guía ISO/IEC 25 que fue publicada en 1990 y que fue fruto de la colaboración entre la Organización Internacional de Normalización (ISO) y la Comisión Electrotécnica Internacional (IEC), esto conllevó a que en 1999, se emitiera la primera ISO/IEC: 17025 basada en la Guía ISO/IEC 25, ya en 2005, se publicó la primera revisión de ISO/IEC 17025, seguida de una segunda revisión 12 años después y se publicó en 2017, lo que convirtió a ISO/IEC 17025 en la tercera versión de la norma que se adopta actualmente (Gutiérrez Lara, 2023).

Esta norma internacional incluye los requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración, haciendo énfasis en los requerimientos técnicos y de gestión que debe tener un laboratorio de ensayo para demostrar que cuenta con un sistema de gestión de calidad en sus operaciones (Eraso Insuasty et al., 2023). Esta norma se divide en dos partes, la primera lleva todos los requisitos relativos a la gestión del laboratorio como lo son el control de documentos, servicio al cliente, acciones correctivas y preventivas, control de registros, entre otros, que permiten manejar la parte administrativa del laboratorio, la segunda parte son los requisitos técnicos, los cuales describen todo lo relacionado con el personal, instalaciones, equipos, procedimientos, el aseguramiento en la calidad de los resultados de ensayo y de calibración, entre otros (ISO/IEC 17025, 2017) .

Así mismo, se espera que los laboratorios que ejecutan métodos microbiológicos, estén adecuadamente equipados para que cumplan los requisitos de bioseguridad y que cuenten con personal competente, así mismo, es muy deseable que tengan sus métodos acreditados bajo el estándar ISO/IEC 17025:2017, ya que les permite demostrar la competencia técnica para ejecutar los ensayos y contar con el reconocimiento de resultados válidos en el mundo globalizado (Singh & Anand, 2021). Ahora bien, la finalidad de un laboratorio es producir información relevante y confiable para la toma de decisiones, estos datos deben ser obtenidos con técnicas analíticas confiables, precisas y adecuadas para su fin (Horwitz, 1982).

De igual manera, la norma ISO/IEC 17025:2017 define el proceso de verificación como: *“aportación de evidencia objetiva de que un ítem dado satisface los requisitos especificados”* (ISO/IEC 17025,2017). Los métodos modificados pueden consistir en desviaciones de un método de referencia estándar o de un procedimiento prescriptivo para su uso continuo. Si el laboratorio demuestra que realiza desviaciones sobre los métodos normalizados, entonces se requerirá una validación de acuerdo con la cláusula 7.2.2 de la norma ISO/IEC 17025:2017, de igual forma el laboratorio debe verificar que puede realizar métodos de forma adecuada antes de introducirlos en su rutina de trabajo, asegurándose de que pueda lograr las características de rendimiento documentadas de acuerdo con la cláusula 7.2.1.5 de ISO/IEC 17025:2017.

A partir de la publicación de la norma ISO/IEC: 17025:2017, la validación y la verificación de los métodos microbiológicos cobra un papel fundamental, en tanto que el trabajo de los laboratorios se centra en demostrar, de manera objetiva, frente a los organismos que otorgan reconocimiento y acreditación, que el método o el sistema de medición seleccionado cumple los parámetros de desempeño establecidos y que el laboratorio es competente para ejecutarlo (INM,2023).

La importancia de la evaluación del desempeño de métodos de ensayo microbiológicos, se ve reflejada en la normalización de esta actividad. Internamente, la Organización Internacional de Estandarización (ISO) en los Comités Técnicos (CT) elabora documentos para orientar la validación/verificación; por ejemplo, el Comité Técnico ISO/CT34 de Productos Alimenticios, publica los estándares de la familia de las ISO 16140, el Comité ISO/CT147 de Calidad del Agua publica el estándar ISO 13843: año y el Comité ISO/CT 212 de Ensayos en Laboratorio clínico y tests con sistemas de Diagnóstico in-vitro es responsable del estándar ISO 15195:2019. Así mismo, hay publicaciones científicas de otras organizaciones que pueden ser consultadas como las de AOAC, FDA, EPA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, las farmacopeas y documentos de Eurachem; así como también documentación de organismos de certificación tales como AFNOR, NMKL y Microval (INM,2023).

Organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Food and Drug Administration (FDA) de EE.UU., y la European Medicines Agency (EMA) también han desarrollado protocolos y guías para la verificación y validación de métodos microbiológicos en diferentes contextos, como la industria farmacéutica, la alimentaria y la ambiental (Ortega González et al., 2013).

Finalmente, la verificación, sólo puede ser aplicada sobre métodos que ya han sido validados, obedece a demostrar su rendimiento de manera objetiva, es decir, a través de algún tipo de trabajo experimental en una extensión menor que el requerido en la validación y demostrará que el laboratorio está en capacidad de ejecutar el método de ensayo cumpliendo con los requisitos establecidos en la etapa de validación (INM,2023).

6. METODOLOGÍA

Tipo de análisis: Este es un estudio retrospectivo y descriptivo, realizado a través de la revisión de los trabajos publicados con relación al tema IMPORTANCIA DE UN PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS SEGÚN REQUISITOS DE LA ISO/IEC 17025:2017.

Se realizó una revisión de la literatura científica, documentos o artículos publicados en bases de datos especializadas de reconocimiento internacional como Springer, Elsevier, Pascal, PubMed, Biological Abstract, Google Scholar y en las bases de datos especializadas de reconocimiento regional tales como: Scielo, Redalyc y Latindex, a través de ecuaciones de búsqueda en inglés y español relacionadas con el tema de interés tales como: Control de calidad (Quality control), Aseguramiento de la calidad (quality assurance), Sistemas de gestión de la calidad (Quality Management Systems), verificación de métodos microbiológicos (Verification of microbiological methods), Verificación de métodos microbiológicos según la ISO17025:2017 (Verification of methods according to ISO17025:2017).

Después de recopilar los artículos pertinentes, se llevó a cabo una organización sistemática de la información proveniente de diversas fuentes, tales como normativas, informes técnicos, publicaciones especializadas, actas de conferencias y tesis. Esta organización se realizó con el fin de realizar un análisis exhaustivo de los documentos más relevantes para el estudio. Se procedió a examinar detalladamente los resúmenes y conclusiones de cada artículo, lo que facilitó la identificación de aquellos que presentaban las ideas y aspectos más relevantes para el tema de investigación. Posteriormente, se priorizaron y seleccionaron los documentos de mayor importancia y pertinencia para ser analizados en profundidad en el desarrollo de la investigación.

7. RESULTADOS

Es importante como primera medida definir las diferencias entre los dos conceptos (tabla 1) claves mencionados en el numeral 7.2 de la ISO/IEC 17025:2017. La ISO 9000:2015 define verificación como “confirmación, a través de la aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos especificados”. El VIM establece que la verificación es “la aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados” y que validación es una “verificación, donde los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto” (EURACHEM, 2016).

Tabla 1. Diferencias en las definiciones de concepto de verificación y validación según la ISO 9000, ISO/IEC 17025:2017 y VIM. Fuente: Autor.

| DIFERENCIAS CONCEPTUALES | | |
|---|---|---------------------------|
| Validación | Verificación | Referencia |
| Confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico previsto | Confirmación, a través de la aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos especificados | ISO 9000 |
| Confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto | Aportación de evidencia objetiva de que un ítem dado satisface los requisitos especificados | ISO/IEC 17025:2017 |
| Verificación, donde los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto | Aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados | VIM |

Por tanto, si un laboratorio está utilizando un método que ya ha sido validado, no es necesario volver a validarlo, pero si debe verificarse el cumplimiento de los parámetros mínimos antes enumerados de forma periódica y cada vez que haya un cambio en el método (Anderson, 2010), definiendo este cambio no de parámetros y condiciones, si no de lote de reactivos, controles y sustancias químicas en el procedimiento (Guía para la evaluación de métodos microbiológicos

INM,2023). Normalmente, la verificación supone determinar el cumplimiento de los parámetros, de una forma menos laboriosa, más práctica, menos estricta y hacer menos tomas de datos experimentales en las mediciones de cada parámetro, en comparación con una validación. Los resultados de la verificación pueden diferir levemente de los obtenidos en la validación, pero deben ser conformes teniendo en cuenta el objetivo de calidad metrológico que se ha definido al validar y utilizar el método en forma retrospectiva; para lograr establecer una guía de verificación de métodos microbiológicos por medio de una búsqueda bibliográfica (objetivo de este trabajo) se presentarán los resultados más relevantes en 3 partes teniendo en cuenta las etapas operativas (Preanalítica, Analítica y Postanalítica) dentro de un laboratorio, con enfoque a laboratorio de microbiología en especial atención, con aplicación en alimentos.

Ahora bien, es importante aclarar que los protocolos y el alcance de la validación/verificación no siempre son los mismos, por lo tanto, se deben establecer claramente el objetivo (el cual debe ser un parámetro de desempeño) en el cual se establecen los límites para cada una de las determinaciones analíticas (IGAC, 2021). Sandoval y colaboradores (2010) expresa que la verificación, tiene generalmente como objetivo, el comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y lo utiliza correctamente, es decir, los laboratorios no necesitan validar si utiliza métodos normalizados, solamente los verifica y los documentan para las evidencias objetivas. Así mismo, este autor propone el siguiente esquema el cual es importante destacar ya que se convierte en una hoja de ruta para quienes desean empezar a validar y/o verificar sus métodos analíticos (figura 2); esta descripción gráfica permitirá establecer la finalidad de la actividad relacionada con el método a verificar y/o validar.

Según Zurita S (2013), el proceso central en un laboratorio se desglosa en tres etapas fundamentales: la preanalítica, la analítica y la postanalítica. En la etapa preanalítica se establece qué se va a medir, se definen las características de la muestra y se determina cómo recolectarla para que sea representativa del mensurando definido. Además, se asegura su correcto etiquetado, manipulación, transporte y almacenamiento, así como su registro y procesamiento una vez recibida en el laboratorio. La etapa analítica implica la ejecución de la prueba analítica en sí misma, incluyendo la medición y el registro de los resultados obtenidos. Por último, la etapa postanalítica se centra en la validación y autorización de los resultados, así como en la elaboración, emisión y

entrega del informe correspondiente por parte del laboratorio. En el contexto de este trabajo monográfico, estas tres etapas del proceso de laboratorio se han adaptado para cumplir con los lineamientos establecidos para la verificación y/o validación de métodos analíticos.

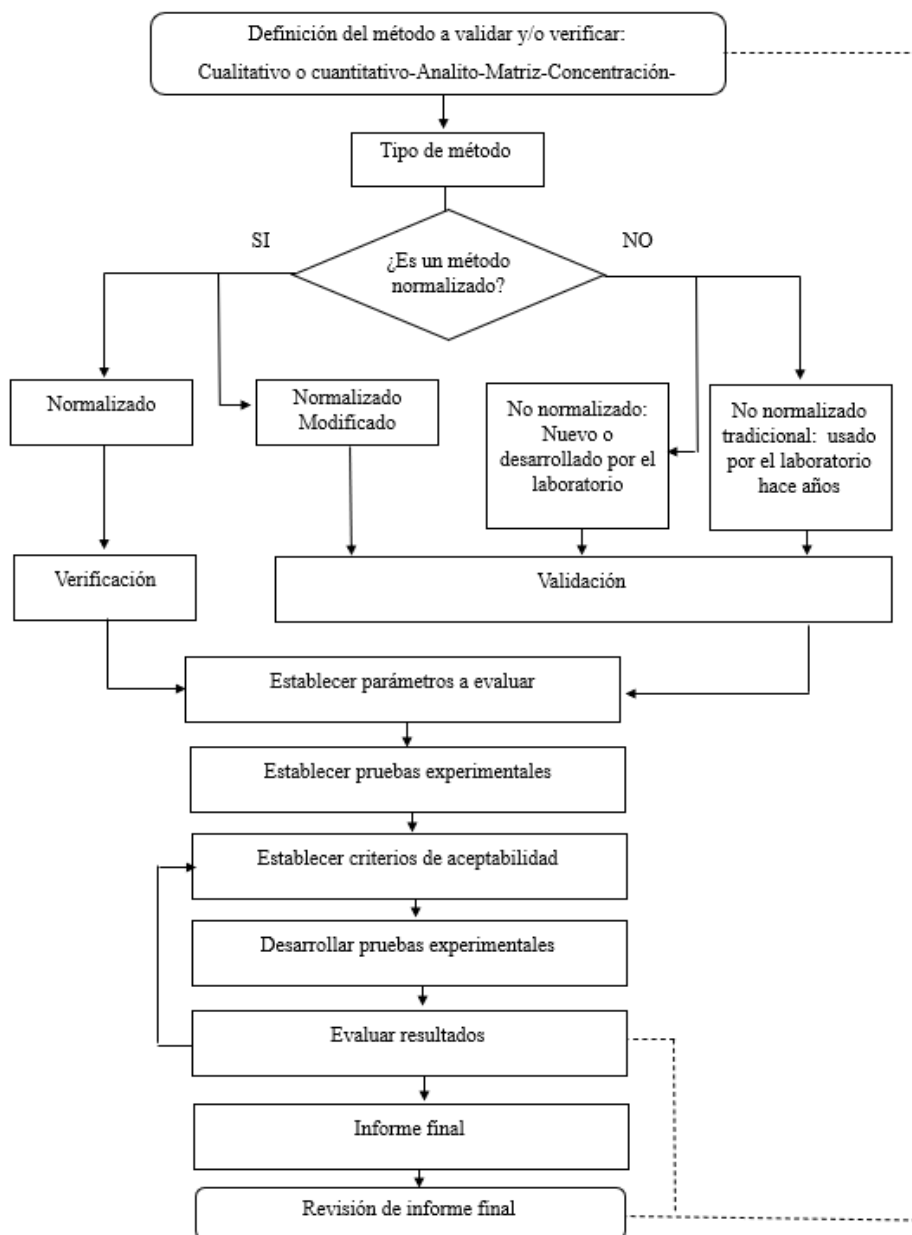


Figura 2. Pasos a seguir para el proceso de validación o verificación de métodos analíticos.

Fuente: Sandoval et al; 2010

-Fase preanalítica a la verificación y/o validación de métodos analíticos:

Según Morato y colaboradores (2023) en la Guía de evaluación de métodos microbiológicos, en esta etapa preanalítica, es muy importante que antes de iniciar la evaluación de desempeño del método, todas las prácticas de control de calidad están diseñadas para garantizar que los procesos del laboratorio están bajo control, es decir, disponer de un protocolo de aseguramiento de la validez de los resultados, que corresponde a un requisito normativo de la ISO/IEC 17025:2017, dado que favorece minimizar los errores sistemáticos y aleatorios resultantes de las variaciones en el personal, la instrumentación, el equipo, los reactivos, los suministros, los métodos de muestreo y análisis, el manejo de los datos y la presentación de los mismos. Por tanto, es imperativo tener en cuenta aspectos relacionados con (figura 3):



Figura 3. Aspectos a tener en cuenta para minimizar los errores sistemáticos y aleatorios.

Este mismo autor, establece que debe de existir un plan de verificación de métodos que al menos debe de incluir: 1) Tipo de verificación y propósito del estudio, 2) Propósito del método y descripción del mismo 3) Detalles del diseño del experimento teniendo en cuentas aspectos tales como: número y tipo de muestras, número de réplicas (incluyendo cuantos días y cuantos analistas), características de desempeño que van a ser evaluadas, registros analíticos, datos estadísticos

(evidencia) y criterios de aceptación, pero de la misma forma se deben de garantizar los materiales y equipamiento necesario, las consideraciones de bioseguridad del métodos, el tiempo estimado para ejecutar el experimento y el informe de verificación, con un posible análisis de causa raíz cuando los resultados obtenidos no son aceptables o no cumplen los límites de aceptabilidad.

Ramirez y colaboradores (2022) en su trabajo “validación del método de ensayo para la determinación del contenido de sales solubles en los suelos utilizado en el área de ensayos químicos del laboratorio Concrelab S.A.S”, menciona 4 aspectos a tener en cuenta antes de validar, los cuales son: Selección del método, reactivos, equipos y materiales, otros autores como Morato y colaboradores (2023) mencionan actividades relacionadas con la forma de preparación del inóculo, la selección de las muestras para los ensayos, y la evaluación de los medios de cultivo o detectores.

El escritor del libro “Buenas prácticas de fabricación en la industria farmacéutica” Ricardo de la Fuente Grimaldo (año), menciona que todas y cada una de las actividades involucradas en la validación deben ser adecuadamente gestionadas, para esto recomienda que debe de diseñarse un Plan Maestro de Validación y/o Verificación (PMV), el cual establece el alcance, las responsabilidades y prioridades del proceso siendo este documento la parte medular del proceso, ya que en él se recopila el listado de equipos, insumos, materiales y áreas involucradas, bajo un enfoque de planificación con tiempos previamente establecidos. Este documento puede convertirse en una herramienta muy valiosa que permitirá medir en tiempo real los avances del trabajo de validación ya que da un bosquejo general del proceso.

Ahora bien, el Instituto de Salud Pública de Chile, 2010 en su documento “Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos, denota que el responsable de la validación o verificación es el encargado de elaborar el Plan de Validación y/o verificación, un documento (tipo protocolo) en el cual se definen previamente a la experiencia; las pruebas o parámetros de validación necesarios y el diseño experimental a desarrollar en base a los requerimientos del método. El “Plan” deberá contener a lo menos 7 aspectos importantes: 1) Alcance de la validación (método, analito, matrices y requerimientos del método, 2) Diseño experimental (establecer la(s) muestra(s) a ser analizada(s): testigos reactivos, blanco matriz, materiales certificados, material control, material(es) de

referencia certificado, matrices de las muestras, etc), 3) El (los) parámetro(s) y pruebas a desarrollar, 4) número de análisis requeridos para cada prueba y/o parámetro. 5) criterios de aceptabilidad para cada parámetro 6) Analista(s) responsable de realizar la(s) prueba(s) analítica(s) 7) Materiales, insumos y equipos necesarios para desarrollar la validación, y por último el responsable de la validación, fecha o tiempo programado para realizar la validación y fecha de elaboración del plan. Cualquier modificación realizada al plan, durante el proceso, debe quedar debidamente documentada.

En Colombia, el Instituto Nacional de Metrología en su documento validación de métodos en análisis químico cuantitativo, del año 2023 recomienda que antes de iniciar la validación de un método se deben definir los requerimientos necesarios para su desarrollo, los parámetros a evaluar, los experimentos que se deben realizar, los tratamientos estadísticos y los criterios de aceptación de los parámetros que permitan evidenciar si el método es apropiado para el fin previsto. Esta información se documenta en el plan o protocolo, el cual contiene todos los detalles relacionados con el proceso, incluyendo las metodologías de tratamiento de datos para obtener las conclusiones. Finalmente, el plan de validación y/o verificación de métodos analíticos en alimentos es esencial para asegurar que el proceso se realice de manera ordenada, precisa y efectiva. Además, proporciona una hoja de ruta clara, que ayuda a garantizar la calidad y confiabilidad de los resultados, y cumple con los requisitos regulatorios necesarios (Ahumada et al, 2023).

Por otro lado, la ISO cuenta con la familia de las normas ISO 16140 como herramienta indispensable que establece los principios y los criterios para la validación de métodos alternativos en microbiología de alimentos (Figura 4), en esta familia compuesta por 6 partes, la ISO16140-3 presenta un enfoque para la verificación en un único laboratorio de métodos de referencia y de métodos alternativos validados. De acuerdo a esta norma, la verificación de un método de ensayo para alimentos se puede adelantar en dos partes: 1) la verificación de implementación y 2) la verificación del tipo (ítem) de alimento. Sin embargo, la aplicación de una o de las dos partes va a depender de la disponibilidad de la información de los datos de validación del método:

-Verificación de implementación: Escoger un tipo de alimento (necesario incluir un tipo de alimento que haya sido evaluado durante la validación) que esté dentro del alcance del método validado.

-Verificación de implementación: Escoger un tipo de alimento (no necesariamente evaluado dentro del estudio de validación) que esté dentro de la categoría de los alimentos incluidos en el estudio de validación.

En relación con los parámetros de desempeño a verificar, la ISO 16140-3 los define en función del tipo de verificación y de la disponibilidad o no, de un método de referencia con datos de validación, que establece como parámetro de evaluación el Límite de detección (LOD50) para métodos cualitativos, con la desviación estándar de reproducibilidad dentro del laboratorio y el sesgo como parámetros de precisión y veracidad para métodos cuantitativos. Esta versión simplifica el proceso con respecto a versiones anteriores, cuando sólo se disponía de documentos para validación y donde quedaba a criterio de los laboratorios los parámetros de verificación a evaluar (tabla 2):

Tabla 2. Validación en un solo laboratorio con enfoque convencional-parámetros de desempeño recomendados para la verificación de métodos. Fuente: INM, 2023

| Tipo de método | Parámetro de desempeño | Tipo de verificación | |
|-----------------------------|--|--------------------------------|----------------------------------|
| | Verificación | Verificación de implementación | Verificación de tipo de alimento |
| Métodos validados | | | |
| Método cualitativo | Límite de detección (LOD50) | si | si |
| Método cuantitativo | Desviación estándar de la reproducibilidad intra-laboratorio | si | No aplica |
| | Sesgo estimado | No aplica | si |
| Métodos no validados | | | |
| Método cualitativo | Límite de detección (LOD50) | No aplica | si |
| Método cuantitativo | Sesgo estimado | No aplica | si |

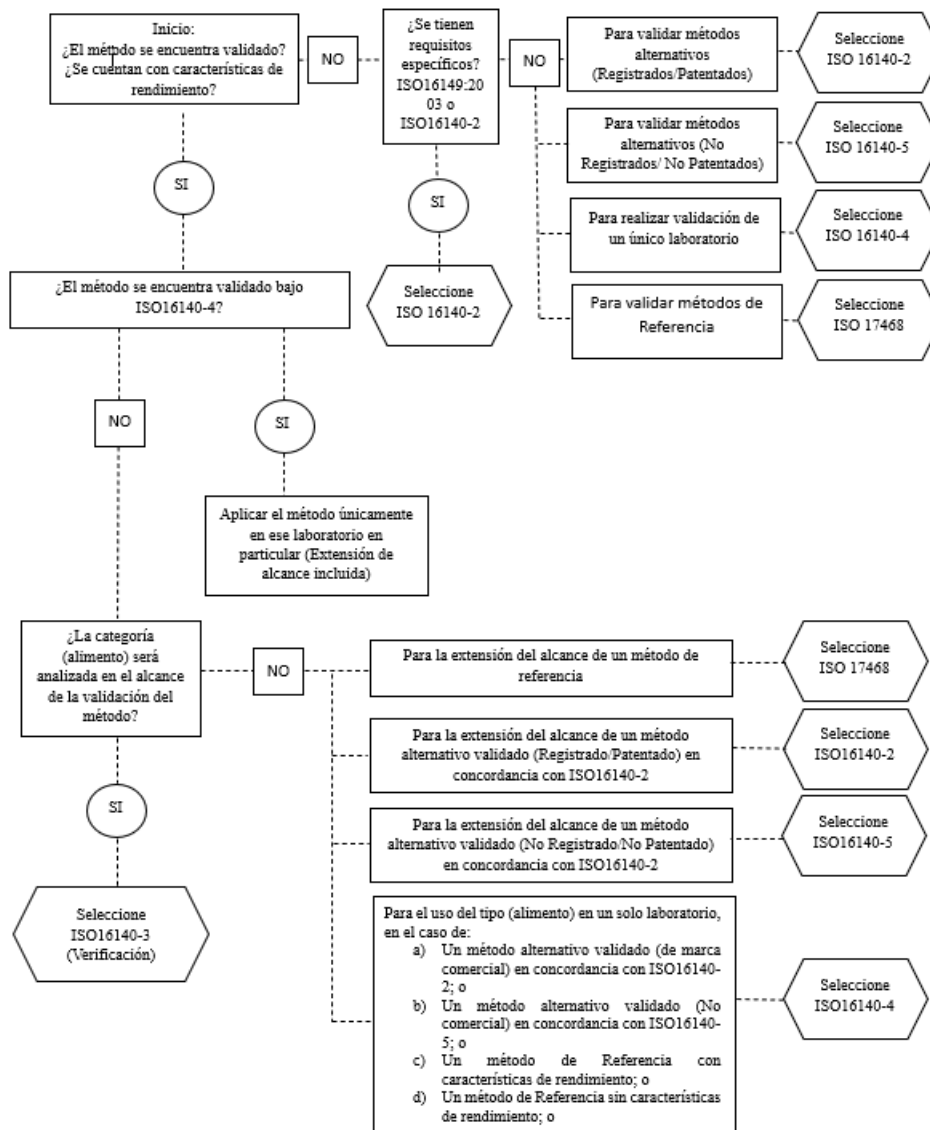


Figura 4. ISO 16140. Diagrama para la selección del protocolo de evaluación del desempeño a realizar. Traducción de figura de ISO 16140 por INM, 2022

-Fase analítica en la verificación y/o validación de métodos analíticos:

Los parámetros de desempeño o también llamados características de desempeño son fundamentales en la verificación de métodos analíticos, especialmente en laboratorios de alimentos y otros sectores donde la precisión y la fiabilidad de los resultados son críticos.

El manual publicado por la Organización de las Naciones Unidas en el año 2010 que da las directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el

análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos, recomienda que los métodos cualitativos de análisis que requieren de verificación, se determine los siguientes parámetros: 1) especificidad/selectividad, si la matriz de la muestra difiere de la utilizada cuando se elaboró el método, 2) límite de detección y Precisión (en condiciones de repetibilidad o reproducibilidad). En el caso de los métodos cualitativos que tienen un umbral de concentración para reflejar resultados, deben determinarse los siguientes parámetros adicionales, tales como exactitud (sesgo) en el umbral de concentración y precisión en el umbral de concentración. A diferencia de los métodos cuantitativos de análisis que exigen la determinación de la siguiente serie de parámetros para su verificación: 1) Especificidad/selectividad y límite de detección si la matriz de la muestra difiere de la utilizada al elaborarse el método 2) Veracidad 3) Precisión (en condiciones de repetibilidad o reproducibilidad).

Morato y colaboradores (2023) expone que para los métodos cualitativos teniendo en cuenta la ISO 16140-3, el único parámetro que se estima para los métodos cualitativos en alimentos es el LOD50, se hace tanto en la verificación de implementación como en la verificación de tipo de alimento. Para eso, la determinación del eLOD50, requiere 3 niveles de inoculación (bajo, intermedio y alto) y para poder establecer este valor estimado, se basa en el número de resultados positivos por nivel de contaminación, esta contaminación se puede hacer con material de referencia certificado o en una concentración conocida baja o con la estandarización del inóculo in-house. Según esto, el objeto del eLOD50 es estimar el nivel de detección, con una probabilidad de detección del 50 % y compararlo con el eLOD50 del método de referencia, de manera que se pueda demostrar que el ensayo realizado en el laboratorio se desempeña (detecta) dentro de los límites adecuados con respecto al método de referencia. La norma propone tres protocolos para determinar el eLOD50 estimado (ver tabla 3), dependiendo de la disponibilidad de materiales de referencia cuantificados o de la habilidad del laboratorio en la preparación del inóculo (y por lo tanto en conseguir el nivel deseado de contaminación).

Ahora bien, si no contamos con MRC para la preparación y estandarización de inóculos de cepas, se recomienda hacer la preparación de los inóculos a partir de un cultivo del microorganismo objetivo, confirmando la concentración del inóculo por recuento en placa, y se realiza una enumeración preliminar de la suspensión microbiana que se utilizará para la verificación del método con la finalidad de contar con una estimación de la concentración del inóculo que se espera

utilizar (ISO 11133:2014/A1:2018). Para el caso de los MR cuantificados, se limita a la preparación de las concentraciones haciendo las diluciones necesarias dependiendo de la contracción inicial de la cepa.

Tabla 3. Protocolos recomendados para determinar el eLOD50 según la ISO 16140-3. Fuente: Traducción ISO 16140-3.

| Nivel de inoculación de la porción de ensayo | | | | | | |
|--|---|--|---|---|--------|----------------------------------|
| Protocolo | Nivel alto 9xLOD50/porción ensayo | Nivel medio 3xLOD50/porción ensayo | Nivel bajo 1xLOD50/porción ensayo | 3 a 5 UFC/4 porción ensayo | Blanco | Número total de replicados |
| 1 | 1 | 4 | 4 | *** | 1 | 10 |
| 2 | *** | 3 | 5 | *** | 1 | 9 |
| 3 | *** | *** | *** | 7 | 1 | 8 |
| Protocolo 1 | | Protocolo 2 | | Protocolo 3 | | |
| Se puede utilizar cuando no hay certeza de lograr el nivel deseado de contaminación de las porciones de ensayo. Esto es relevante cuando se usa un cultivo sin conocimiento previo del nivel real del inóculo para inocular las porciones de ensayo. | | Se puede utilizar si el primer protocolo elegido no funcionó como se esperaba y el experimento debe repetirse. Se pueden utilizar diluciones adicionales a las prescritas para cualquiera de los protocolos para minimizar la necesidad de repetir el experimento cuando los niveles de inoculación no cumplen con los requisitos. | | Se puede utilizar cuando se conoce el nivel de contaminación del inóculo, cuando se utiliza un material de referencia con concentración conocida. | | |

Según la ISO 16140-3, recomienda lo siguiente, los dos primeros protocolos aplican cuando se usan cepas sin concentración conocida, por lo que el laboratorio debe establecer la concentración del inóculo:

En el primer protocolo, se propone preparar muestras de ensayo contaminadas en tres niveles de concentración: 1, 3 y 9 veces el LOD50 del método de referencia, y un blanco. Evaluando 1 réplica para el nivel más alto, 4 réplicas para los más bajos y 1 para el blanco (que es la que el laboratorio debe evaluar primero).

En el segundo protocolo, se preparan solo dos niveles de concentración: 1 y 3 veces el LOD50 del método de referencia y el blanco. Evaluando 3, 4 y 1 réplicas respectivamente. La norma

recomienda emplear este protocolo por si no resulta como se esperaba el desempeño con el primer protocolo.

La aplicación del tercer protocolo depende de la disponibilidad de MR cuantificados, ya que requiere la preparación de una muestra contaminada entre 3 - 5 UFC / porción de ensayo haciendo 7 réplicas. Usando este protocolo no se calcula el eLOD50. El resultado de la verificación del LOD50 del método de referencia se cumple si al menos 6 de las 7 réplicas son positivas, obteniendo conteos menores o iguales a 5 UFC /porción de ensayo.

El criterio de aceptación definido es que el eLOD50 debe ser menor a 4 veces el LOD50 del método validado (Ecuación 1).

$$\mathbf{eLOD50 < 4*LOD50}$$

Ecuación 1

Fuente: INM, 2023

Este mismo autor Morato y colaboradores (2023), para métodos cuantitativos propone que para la verificación de la implementación del método, el objetivo es calcular la variabilidad del método bajo el efecto de diferentes factores de variación en el laboratorio y compararlo con la menor variabilidad obtenida en el estudio interlaboratorio para la validación del método (tabla 2). Como su nombre lo indica, se mide a través de la desviación estándar de reproducibilidad dentro del laboratorio (SIR), que corresponde a la incertidumbre técnica y es uno de los tres componentes principales de la incertidumbre (técnica, matricial y distribucional) descritos en la norma ISO 19036:2019 y es calculada a partir de los recuentos obtenidos por muestras pareadas medidas bajo diferentes condiciones. El criterio de aceptación está dado en la ecuación 2:

$$\mathbf{SIR(método verificado) < 2 \times SR (método validado)}$$

SIR: desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio.
SR: desviación estándar de reproducibilidad interlaboratorio

Ecuación 2

Fuente: INM, 2023

El diseño del estudio incluye como mínimo 10 muestras del mismo ítem (alimento) que esté incluido en el alcance de la validación del método de referencia, que representen la variabilidad natural de la población (ejemplo diferentes lotes, diferentes proveedores, etc) y que cubran el intervalo de concentración natural encontrado en las muestras analizadas en el laboratorio, para lo cual se pueden fortificar. Vale la pena mencionar, que las condiciones de evaluación con diferentes analistas, lotes de producción de medios de cultivos y reactivos, así como diferentes cepas, son responsables de la mayor variabilidad en los resultados de los análisis.

La desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio (SIR), se determina de acuerdo con la Figura 5, es independiente de la matriz ya que los experimentos están diseñados para excluir contribuciones de la heterogeneidad de la matriz, por lo que se puede seleccionar cualquier ítem (alimento) dentro del alcance de la validación. Se recomienda seleccionar un ítem (alimento) que pueda homogeneizar eficazmente para minimizar el efecto de la incertidumbre de la matriz. Se requiere la preparación del inóculo, para lo cual se pueden escoger alimentos naturalmente contaminados, se pueden considerar el uso de cepas de una colección de cultivos (de una colección propia del laboratorio) o un material de referencia. Si el laboratorio no dispone de material de referencia de concentración conocida, debe estimar el nivel de concentración (fase estacionaria o usar densidad óptica) en UFC/mL de la cepa cultivada en medio líquido en condiciones que permitan un óptimo desarrollo (ISO 11133:2014).

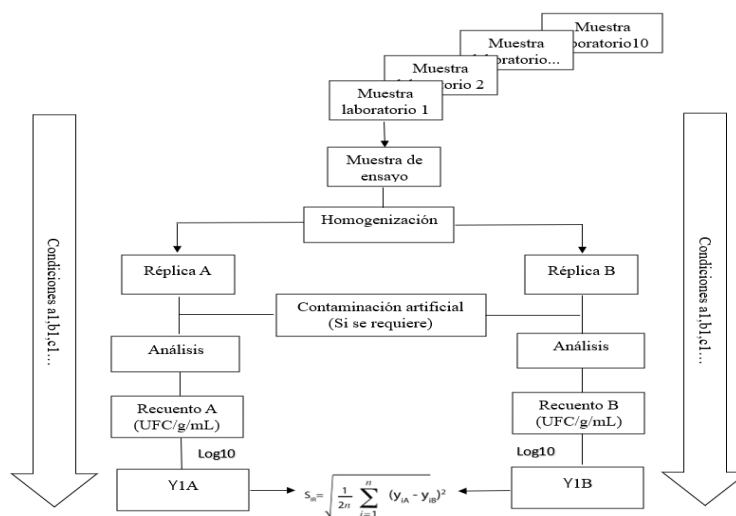


Figura 5. Proceso para determinación SIR de un alimento en un laboratorio. Fuente: INM, 2023.

El inóculo preparado se introduce directamente en la suspensión inicial de las porciones de ensayo individuales. Cada muestra debe ser homogeneizada y a partir de esta se divide en dos porciones iguales (Réplicas A y B), las cuales serán medidas por el método de ensayo a verificar, pero bajo diferentes condiciones, es decir, deben variar de tantas maneras como sea posible dentro del alcance de la validación (que pueden ser: analistas (a), equipos (b), lotes de reactivos/medios de cultivo (c), diferentes cepas (d) , entre otras) de manera que cubran la variabilidad normal que podría tener el método en el laboratorio. Ver figura 5.

donde:

i: índice de las muestras del laboratorio, $i=1$ hasta n ($n \geq 10$)

n: número de muestras

yiA, yiB: log10 de los recuentos de las muestras A y B respectivamente obtenidos por el método de ensayo con las condiciones a, b y c aplicadas.

La SIR (ecuación 2) se calcula a partir de la raíz de la suma de las diferencias cuadráticas entre los Log10 de los recuentos obtenidos para cada una de las réplicas, esto para cada una de las 10 muestras (alimentos) seleccionadas. Ver figura 5 y EC. 2.

El límite de aceptabilidad o criterio de aceptación será:

$$\mathbf{SIR \leq 2 \times SR}$$

Ecuación 3

La desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio (SIR) del método verificado que debe ser ≤ 2 veces el valor medio más bajo de la desviación estándar de reproducibilidad interlaboratorio (SR) hallado para los ítems (alimentos) evaluados en el estudio de validación Ecuación 2

Cuando sólo se determina un valor (SR) en el estudio de validación, la (SIR) del método verificado se compara solo con ese valor reportado. Será evaluado de la misma forma, no debe ser ≤ 2 veces la desviación estándar de reproducibilidad (SR) (WHO, 2019).

Otro parámetro muy importante dentro de la verificación de métodos cuantitativos y recomendado por Morato y colaboradores (2023) es el sesgo estimado el cual aplica para la verificación del tipo de alimento, tanto para métodos validados como no validados, que hace referencia a la diferencia o proximidad entre los resultados de los recuentos obtenidos para un conjunto de muestras inoculadas y el inóculo, en tres niveles de concentración. Como criterio de aceptación se tiene que este debe ser menor o igual a $0.5 \text{ Log}10$.

De manera general, el diseño experimental propuesto contempla las siguientes etapas:

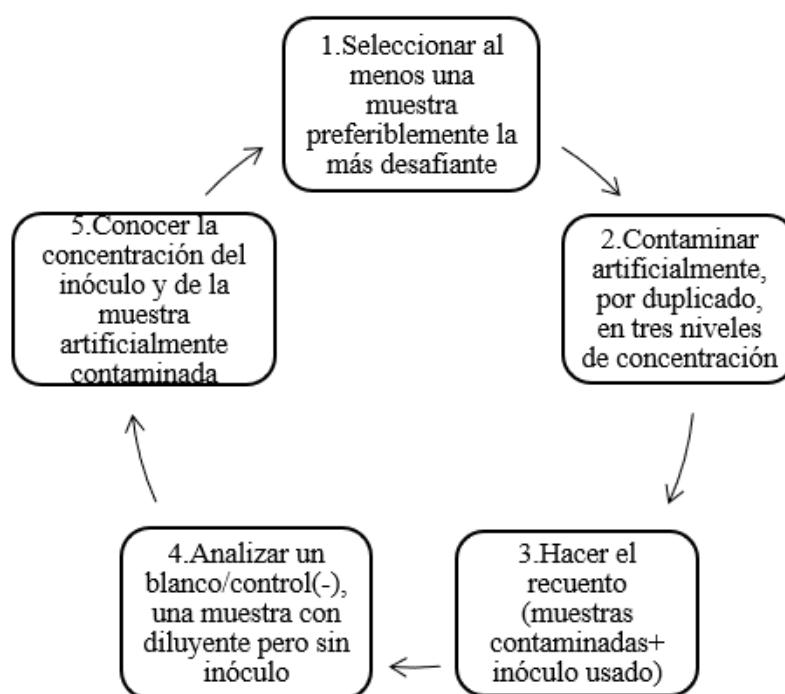


Figura 6. Modelo experimental propuesta por etapas.

O en términos relativos en porcentaje (Ecuación 4):

$$b (\%) = \frac{X - X_{ref}}{X_{ref}} * 100$$

Ecuación 4

X: Media de los resultados.

Xref: Valor de referencia adecuado

Para el cálculo del sesgo, se comparan los resultados obtenidos a partir de la concentración del inóculo (en Log10 UFC /mL) con el de las muestras analizadas (Log10 UFC / Porción de ensayo). La preparación de los inóculos y los cálculos de la concentración de bacterias inoculadas en las muestras son actividades relevantes para hacer la estimación de los parámetros. A continuación, un ejemplo para ilustrar:

- Inóculo de *E. coli* preparado en el laboratorio:

1115 UFC/g (3.05 Log10 UFC/g)

- Muestra (ítem) de alimento contaminado:

1200 UFC/10g(3.05 Log10 UFC/10g)

EL cálculo del sesgo estimado es:

$$3.05 \text{ Log10 UFC/g} - 3.08 \text{ Log10 UFC/10 g} = 0.03 \text{ Log10 UFC/10 g}$$

-Fase postanalítica en la verificación y/o validación de métodos analíticos:

En el cumplimiento de su función el laboratorio desarrolla su proceso total de análisis a través tres fases estrechamente interconectadas, finalmente la fase postanalítica última etapa del proceso central de laboratorio donde se validan los datos obtenidos, se elabora el informe y se comunican los resultados para los efectos de su interpretación y acción dado los hallazgos encontrados (Rueda P, 2014).

En 2022 en la publicación de la Guía General de actividades para la verificación y validación de métodos del Organismo Dominicano de acreditación, recomienda que la realización del informe de verificación de forma general debe incluirse como mínimo el siguiente contenido a) Identificación del método recomendado cuya aplicación por el laboratorio se quiere verificar. b) Identificación del/de los procedimientos/s que utiliza el laboratorio para llevar a cabo la actividad de ensayo, calibración o muestreo. c) Identificación de cada uno de los requisitos establecidos en

el método de ensayo. d) Identificación para cada requisito del documento/ formato/ etc. del sistema de gestión del laboratorio que contempla dicho requisito. e) Cuando sean necesarias para demostrar el cumplimiento de los requisitos, registros u otras evidencias que demuestren que se cumplen por el laboratorio los requisitos contemplados en el método recomendado y en el laboratorio. f) Evaluación de cumplimiento para cada uno de los requisitos aplicables del método.

De otro lado, EUROCHEM, en su Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados del año 2016, aclara que tanto los trabajos de validación como la información de sus resultados se realizan atendiendo a un procedimiento documentado. El esquema del plan de validación ('protocolo de validación') y el informe de la validación pueden establecerse en guías sectoriales que son una gran ayuda para la interpretación, y en algunos casos las entidades nacionales de acreditación pueden establecer requisitos mínimos para esta documentación (INAB, 2012). No obstante, para que exista un engranaje entre el plan y el informe de validación Barwick et al; 2016 presenta un modelo sencillo con las siguientes secciones: 1) Título: En esta sección debe identificarse el método, el momento y quién realizó la validación. Se debe dar una breve información sobre el alcance y una sencilla descripción del método, así como la información sobre el estado del método (por ejemplo, una norma internacional, un método desarrollado internamente, etc.), el analito, el mensurando, unidad de medida, el tipo de muestra y el uso previsto. 2) Planificación: Esta sección debe describir el propósito, por ejemplo, validación completa de un nuevo método, verificación del desempeño de un método normalizado, extensión del alcance del método, etc. Debe indicarse la extensión de la validación, por ejemplo, indicando las características de desempeño que van a evaluarse y los requisitos asociados. 3) Características de desempeño: Esta sección incluirá una breve explicación de las características de desempeño del método, requerimientos específicos, descripción de los experimentos a realizar y la evaluación de los resultados obtenidos. Deben declararse los resultados y conclusiones derivados de los experimentos. Cada característica de desempeño se recoge en secciones separadas del informe. 4) Resumen: La última sección debe recapitular el trabajo de validación y/o verificación y sus resultados. Pueden contemplarse además actuaciones relacionadas con el uso rutinario del método y con requisitos de control de calidad interno y externo.

Según Ahumada y colaboradores (2023) un informe de validación debe contener como mínimo lo siguiente: 1) Objetivo y alcance de la validación: dentro del objetivo y el alcance se deberá

mencionar el método de medición que se validó y la descripción del mensurando con sus niveles de concentración, 2) Método de medición: descripción del procedimiento de medición, 3) Metodología experimental: resumen de los experimentos realizados, 4) Parámetros evaluados, los requisitos o criterios de aceptación definidos, el resultado obtenido y el concepto donde se indique el cumplimiento de los requisitos o criterios de aceptación, 5) la conclusión y declaración sobre si el método de medición es adecuado o apto para su uso previsto, y por último, el nombre del responsable y fecha de la elaboración.

GUÍA PROPUESTA DE PLANIFICACIÓN PARA LA VERIFICACIÓN Y/O VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CON APLICACIÓN EN ALIMENTOS

A continuación, se presenta una guía práctica de planificación para la verificación y/o validación de métodos microbiológicos con aplicación en alimentos, esta guía está dividida en las 3 etapas del proceso central de un laboratorio:

Etapla preanalítica: Dentro de esta etapa es importante definir el plan de verificación y/o validación de métodos, en esta fase se describen las actividades relacionadas con:

1) Tipo de verificación y propósito del estudio, en este ítem es importante determinar si el método es cualitativo o cuantitativo, 2) Propósito del método y descripción del mismo (selección del método, reactivos, equipos, materiales, preparación del inóculo) 3) Detalles del diseño del experimento como: número y tipo de muestras, número de réplicas, características de desempeño a evaluar: para métodos cualitativos se estima el límite de detección (LOD50) y para métodos cuantitativos se estima la desviación estándar de la reproducibilidad intra-laboratorio y el sesgo estimado; otros aspectos que se deben de tener en cuenta son los registros analíticos, datos estadísticos (evidencia) y criterios de aceptación, garantizando los materiales, equipamiento, bioseguridad del método, el tiempo para ejecutar el experimento y el informe de verificación, con un posible análisis de causa raíz cuando los resultados obtenidos no son aceptables o no cumplen los límites de aceptabilidad.

Etapla analítica: En esta fase se evalúan los parámetros de desempeño y criterio de aceptación según el tipo de método:

Parámetros a determinar en métodos cualitativos de análisis: 1) Especificidad/selectividad, 2) límite de detección y precisión (en condiciones de repetibilidad o reproducibilidad). Si tienen un umbral de concentración (se tiene MRC), deben determinarse los siguientes parámetros adicionales, como veracidad y precisión (en el umbral de concentración).

Parámetros a determinar en métodos cuantitativos de análisis: 1) Especificidad/selectividad y límite de detección si la matriz de la muestra difiere de la utilizada al elaborarse el método 2) Veracidad 3) Precisión (en condiciones de repetibilidad o reproducibilidad).

En métodos analíticos en alimentos, para métodos cualitativos se estima el LOD50, (verificación de implementación/verificación de tipo de alimento), requiere 3 niveles de inoculación (bajo, intermedio y alto haciendo las diluciones necesarias), cuyo objeto es estimar el nivel de detección, con una probabilidad de detección del 50 % vs. eLOD50 del método de referencia.

Si no se tiene MRC se hace la preparación de los inóculos a partir de un cultivo del microorganismo objetivo, confirmando la concentración del inóculo, con una estimación de la concentración.

El criterio de aceptación definido: El eLOD50 debe ser menor a 4 veces el LOD50 del método validado.

$$\mathbf{eLOD50 < 4*LOD50}$$

Ecuación 1

En métodos analíticos en alimentos, para métodos cuantitativos el objetivo es calcular la variabilidad del método bajo el efecto de diferentes factores de variación en el laboratorio (Intralaboratorio) y compararlo con la menor variabilidad obtenida en el estudio interlaboratorio para la validación del método.

$$\mathbf{SIR(método verificado) < 2 \times SR (método validado)}$$

SIR: desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio.

SR: desviación estándar de reproducibilidad interlaboratorio

Ecuación 2

El límite de aceptabilidad o criterio de aceptación será: La desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio (SIR) del método verificado que debe ser ≤ 2 veces el valor medio más bajo de la desviación estándar de reproducibilidad interlaboratorio (SR):

$$\text{SIR} \leq 2 \times \text{SR}$$

Ecuación 3

Otro parámetro para métodos cuantitativos es el sesgo, este hace referencia a la diferencia o proximidad entre los resultados de los recuentos obtenidos para un conjunto de muestras inoculadas y el inóculo, en tres niveles de concentración. Para el cálculo del sesgo, se comparan los resultados obtenidos a partir de la concentración del inóculo (en Log₁₀ UFC/mL) con el de las muestras analizadas (Log₁₀ UFC/Porción de ensayo).

- Inóculo de *E. coli* preparado en el laboratorio:

1115 UFC/g (3.05 Log₁₀ UFC/g)

- Muestra (ítem) de alimento contaminado:

1200 UFC/10g (3.05 Log₁₀ UFC/10g)

EL cálculo del sesgo estimado es:

$$3.05 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g} - 3.08 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/10 g} = 0.03 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/10 g}$$

El criterio de aceptación es: Diferencia entre el inóculo y la muestra contaminada debe ser menor o igual a 0.5 Log₁₀.

$$3.05 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g} - 3.08 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/10 g} = 0.03 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/10 g}$$

Etapa Postanalítica: En esta fase se consolidan los datos obtenidos, y se elabora el informe, con las siguientes secciones:

1) Título, que contiene la identificación del método (aplicación), fecha y responsable de la validación, objetivo, alcance de la validación y una descripción del método (niveles de

concentración) 2) Identificación del/de los procedimientos/s (ensayo, calibración o muestreo), 3) Identificación de los requisitos y parámetros evaluados, 4) Identificación de requisitos del sistema de gestión, 5) Registros, 6) Concepto y evaluación de cumplimiento para cada uno de los requerimientos aplicables del método, 7) Resultados, conclusiones y declaración de si el método de medición es adecuado o apto para su uso previsto.

8. DISCUSIÓN

Como resultado de la búsqueda bibliográfica del tema en relación al tema de este documento “IMPORTANCIA DE UN PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS SEGÚN REQUISITOS DE LA ISO/IEC 17025:2017”, se encontró que actualmente las guías específicas para la verificación de métodos microbiológicos no son tan comunes y en principio la mayoría de las guías diseñadas actualmente, se centran en la validación de métodos como herramienta principal, dejando de un lado la verificación. A nivel de Colombia, es importante destacar el trabajo que ha realizado el Instituto Nacional de Metrología (INM) en la actualización de documentos guías que sean apoyo para los laboratorios a nivel nacional, dentro de ellos se resalta la guía para la evaluación de métodos microbiológicos en alimentos del año 2023 con un enfoque muy amplio tomando en cuenta la validación y la verificación de los métodos analíticos, a sí mismo, la Guía de Validación de Métodos en Análisis Químico Cuantitativo, aunque su enfoque es netamente de validación, da una orientación muy completa de los aspectos que hay que tener al momento de validar un método, adicionando que de esta forma es aplicable no solo a la parte de análisis químico sino también a otros tipo de laboratorio en donde sus matrices de estudio son diferentes a las establecidas en dicho documento.

De igual forma, otras instituciones del territorio nacional como el Instituto Geográfico Agustín Codazzi y el Instituto Nacional de Salud, en los años 2021 y 2018, publicaron un instructivo de validación y verificación de los métodos analíticos en el laboratorio nacional de suelos, con los lineamientos técnicos para la evaluación de métodos de ensayos, respectivamente, estos dos documentos oficiales dan directrices en el campo de los métodos de análisis en el ambiental y en los laboratorios de salud pública.

Los cuatro documentos mencionados son de gran importancia ya que se convierten en herramientas indispensables para fortalecer los procesos de validación y verificación establecidos en el numeral 7.2 de la NTC-ISO/IEC 17025:2017 relacionados con la selección, verificación y validación.

A nivel de América Latina, las diferentes instituciones no se han quedado atrás en términos de la validación y/o verificación de los métodos analíticos en los laboratorios, aunque América Latina aún posee un atraso en el fortalecimiento de los sistemas de calidad. Garzón, 2015 comenta que a

pesar de los recursos en los laboratorios son limitados, la implementación de los sistemas de gestión los cuales, hace unos años era un objetivo, hoy en una América Latina un poco más madura en los temas metrológicos, se han entendido como una herramienta y no el fin; que son el vehículo que permite el logro de los objetivos organizacionales.

De los documentos oficiales de América latina, es necesario destacar que el Instituto de Salud Pública de Chile, publicó en el año 2010 una Guía Práctica sobre la validación de métodos la cual tiene como objetivo, entregar recomendaciones a los laboratorios para realizar la validación de los métodos analíticos e introducirlos en el concepto de incertidumbre de la medición, y proporciona un marco claro y detallado para llevar a cabo la validación de métodos en laboratorios clínicos y de investigación en Chile incluyendo la evaluación de la exactitud, precisión, linealidad, sensibilidad, especificidad y robustez de los métodos de prueba.

A nivel de Europa y otros países, Eurachem en la Guía “La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos” la cual ofrece los avances producidos en el conocimiento técnico de los conceptos metrológicos en el mundo de los ensayos químicos, compartiendo la experiencia de los laboratorios en términos de veracidad, repetibilidad, reproducibilidad incertidumbre, la selectividad y robustez de los análisis químicos. Por lo tanto, la guía propuesta proporciona orientación sobre cómo evaluar y demostrar la adecuación de un método analítico para un uso específico y cubre una amplia gama de temas relacionados con la validación, verificación y garantía de la calidad de los métodos analíticos.

Pero otros documentos también oficiales, como el de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, su publicación de las Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas, en materiales incautados y especímenes biológicos, proporciona las pautas específicas para validar métodos analíticos, particularmente importantes en el ámbito forense y de aplicación legal, donde es fundamental contar con métodos analíticos confiables y equipos calibrados para garantizar la precisión y la integridad de los resultados.

Todos y cada uno de estos documentos presentan un enfoque para áreas específicas, que van desde métodos analíticos para alimentos, en matrices ambientales y para análisis químicos (drogas), entre otros. Esto es una ventaja porque da una orientación según el interés propio del laboratorio, pero analizando la disponibilidad de guía con enfoque de alimentos, la información es escasa siendo el único documento aplicable a esta área, publicado por el Instituto Nacional de Metrología Colombiano.

Lo anterior se convierte en un desafío para los expertos en ciencias de alimentos, ya que existe una obligación inminente en fortalecer la información relacionada a la verificación y/o validación de los métodos analíticos disponibles, debido a la responsabilidad de este sector en salvaguardar los intereses de la salud pública, que lo hace aún más necesario.

A continuación, se presenta un estado de los documentos disponibles a nivel internacional, relacionados con la verificación y/o validación de métodos analíticos (tabla 4).

Sin embargo, de los anteriores documentos disponibles, solo el documento del Instituto de Metrología de Colombia denominado “Guía para la evaluación de métodos microbiológicos” del año 2023, es específico para el área de la microbiología de los alimentos. Esta falta de guías especializadas en la verificación y validación de métodos en microbiología representa una carencia significativa en el campo. La escasez de recursos específicos dificulta la implementación de prácticas estandarizadas y confiables para garantizar la precisión y la calidad de los resultados en los análisis microbiológicos. Esto puede generar incertidumbre en los procesos de evaluación y control de calidad, comprometiendo la seguridad alimentaria y la salud pública. Es crucial que se promueva el desarrollo y la difusión de guías actualizadas y completas para abordar esta necesidad imperiosa en la microbiología.

Tabla 4. Documentos oficiales a nivel nacional e internacional relacionados con la verificación y/o validación de métodos analíticos. Fuente: Autor.

| | INSTITUCIÓN | DOCUMENTOS OFICIALES |
|--|--|--|
| COLOMBIA | Instituto Nacional de Metrología (INM) | Guía para la evaluación de métodos microbiológicos en alimentos |
| | Instituto Nacional de Metrología (INM) | Guía de Validación de Métodos en Análisis Químico Cuantitativo |
| | IGAC (Instituto Geográfico Agustín Codazzi) | Validación-Verificación de los métodos analíticos en el laboratorio nacional de suelos-LNS |
| | INS (Instituto Nacional de Salud) | Lineamientos técnicos para la evaluación de métodos de ensayo-Versión 02 |
| AMERICA LATINA | Organismo de Acreditación de Argentina (OAA) | Guía para la validación de métodos de ensayo |
| | Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) | Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos" |
| | Centro Nacional de Metrología (CENAM) | Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico |
| | Organismo Dominicano de Acreditación (ODAC) | Guía general de actividades para la verificación y validación de métodos |
| | Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE) | Validación y/o verificación de métodos de ensayos en laboratorios clínicos |
| Ente Costarricense de Acreditación (ECA) | Política de validación de métodos código ECA-MC-PO01 | |
| OTROS | EURACHEM | La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos |
| | Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito | Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos |

9. RECOMENDACIONES

Para evaluar la aplicabilidad del documento propuesto "GUÍA PROPUESTA DE PLANIFICACIÓN PARA LA VERIFICACIÓN Y/O VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CON APLICACIÓN EN ALIMENTOS", se sugiere emplear datos experimentales reales. Esto permitirá una aproximación más precisa para determinar si la guía se adapta eficazmente a las necesidades específicas, o si requiere ajustes para mejorar la pertinencia y la utilidad de la información proporcionada.

En Colombia, dada su condición de productor de una extensa gama de alimentos y con una diversificada industria alimentaria, es esencial que los laboratorios, como entidades de control de salud pública, se mantengan actualizados en la implementación de guías para estandarizar los procesos de verificación y/o validación de métodos. Esto se hace necesario para garantizar la entrega de resultados precisos y confiables, lo cual contribuye a asegurar la validez de los análisis realizados en pro de la seguridad alimentaria.

10. CONCLUSIONES

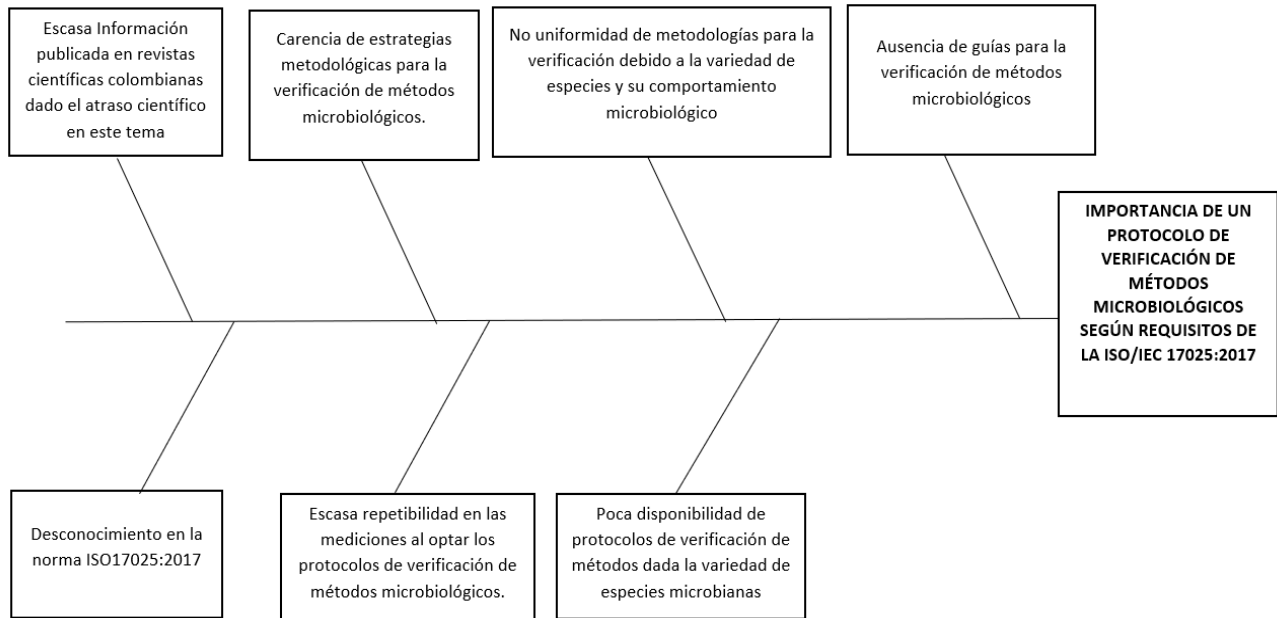
-La disponibilidad limitada de guías específicas para la verificación y validación de métodos analíticos de alimentos plantea un desafío significativo para la industria alimentaria y los laboratorios encargados del análisis de alimentos. La falta de directrices claras y estandarizadas dificulta la garantía de la calidad y la fiabilidad de los resultados analíticos, lo que a su vez compromete la seguridad alimentaria y la salud pública, por tanto, se requiere un esfuerzo colaborativo entre organizaciones internacionales, reguladores, industria alimentaria y la comunidad científica para desarrollar y promulgar directrices actualizadas y exhaustivas para la verificación y validación de métodos analíticos de alimentos.

-La escasa disponibilidad de Material de Referencia certificado representa un desafío significativo para la calidad y la fiabilidad de los resultados analíticos en una variedad de campos, desde la industria farmacéutica hasta la seguridad alimentaria y la protección del medio ambiente. Los Materiales de Referencia certificados desempeñan un papel fundamental en la calibración, verificación y validación de métodos analíticos, así como en la evaluación de la exactitud y la precisión de los resultados obtenidos, esto, puede dificultar la comparabilidad y la reproducibilidad de los resultados entre diferentes laboratorios y métodos analíticos, lo que a su vez puede comprometer la calidad y la integridad de los datos obtenidos.

-La guía proporcionada para la planificación de la verificación y/o validación de métodos microbiológicos con aplicación en alimentos es una herramienta extremadamente útil y aplicable en el contexto de laboratorios que trabajan en la industria alimentaria. Su estructura detallada y su enfoque en las tres etapas clave del proceso analítico (preanalítica, analítica y postanalítica) aseguran una planificación exhaustiva y una ejecución eficiente del estudio de verificación o validación. Su enfoque detallado en cada etapa del proceso analítico asegura la calidad y la fiabilidad de los resultados, lo que la convierte en una herramienta altamente valiosa y aplicable en el ámbito de la seguridad alimentaria.

11. ANEXOS

Anexo I. Diagrama de Ishikawa para la identificación de las causas potenciales por las cuales es importante un protocolo de verificación de métodos microbiológicos.



11. BIBLIOGRAFÍA

Anderson, R. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. *Unodc, 1*.

Badrick, T. (2021). Integrating quality control and external quality assurance. In *Clinical Biochemistry* (Vol. 95). <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2021.05.003>

Camaró-Sala, M. L., Martínez-García, R., Olmos-Martínez, P., Catalá-Cuenca, V., Ocete-Mochón, M. D., & Gimeno-Cardona, C. (2015). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 33*(7). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.010>

Christoffersen, S. (2015). The importance of microbiological testing for establishing cause of death in 42 forensic autopsies. *Forensic Science International, 250*. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.02.020>

De la fuente Grimaldo Ricardo. 2021. Buenas prácticas de fabricación en la industria farmacéutica.

Diego A. Ahumada, Cristhian Paredes, Johanna Abella, Ivonne González. Instituto Nacional de Metrología de Colombia. 2023. Guía de Validación de Métodos en Análisis Químico Cuantitativo. https://inm.gov.co/web/wp-content/uploads/2023/05/Guia_ValidacionMetodosAnalisisQuimicoCuantitativo-16.pdf

Eraso Insuasty, J., Cipagauta Esquivel, E., & Wilches Torres, L. (2023). Propuesta de integración de la ISO/IEC 17025 e ISO 9001 en los laboratorios de la Universidad de Boyacá. *Revista Ingeniería Industrial: Actualidad y Nuevas Tendencias, 8*(30). <https://doi.org/10.54139/riiant.v8i30.479>

EURACHEM. (2016). La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas relacionados. In *Eurachem: Vol. Segunda Ed.*

Evaluación de riesgos microbiológicos en alimentos. Guía para implementación en los países. (2021). In *Evaluación de riesgos microbiológicos en alimentos. Guía para implementación en los países*. <https://doi.org/10.37774/9789275323250>

Fao. (2013). Quality assurance for microbiology in feed analysis laboratories. In *FAO Animal Production and Health Manual No. 14*. (Issue October).

Feldsine, P., Abeyta, C., & Andrews, W. H. (2002). AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. *Journal of AOAC International*, 85(5). <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.5.1187>

García P., M., Quispe A., C., & Ráez G., L. (2014). MEJORA CONTINUA DE LA CALIDAD EN LOS PROCESOS. *Industrial Data*, 6(1). <https://doi.org/10.15381/idata.v6i1.5992>

Garzón, A. C. (s.f.). Sistemas de gestión en el laboratorio clínico en Latinoamérica. *Sistemas de gestión en el laboratorio clínico en Latinoamérica*, 26(4), págs. 221-225.

Gavin, J. J. (1959). Analytical Microbiology. *Applied Microbiology*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/am.7.3.180-192.1959>

Guglielmono, R., De Elías, R., Kiener, O., Collino, C., & Barzón, S. (2011). Control de Calidad. In *Acta Bioquím Clín Latinoam* (Vol. 45, Issue 2).

Gutiérrez Lara, R. (2023). Un análisis de los cambios en la nueva inversión 2017 de ISO 17025 y en las directrices de INACAL y su efecto sobre laboratorios acreditados peruanos. *Review of Global Management*, 6(2). <https://doi.org/10.19083/rgm.v6i2.1771>

Honsa, J. D., & McIntyre, D. A. (2003). ISO 17025: Practical benefits of implementing a quality system. *Journal of AOAC International*, 86(5). <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.5.1038>

Horwitz, W. (1982). Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Analytical Chemistry*, 54(1). <https://doi.org/10.1021/ac00238a765>

International Organization for Standardization ISO. ISO 11133:2014 Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media. 94 at (2014).

Luis Herrera, M., & Campos, M. (2007). Control de la Calidad para un Laboratorio de Microbiología. *Revista Médica Del Hospital Nacional de Niños*.

Montaño, N., Sandoval, A., Ricalde, S., & Sánchez, J. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Revista Ciencia y Cultura Elementos*, 77.

OECD. (1981). 1 . Introduction To the Oecd Principles of GIp. *Quality Assurance*.

Ojeda, M., & Lozada, L. (2000). Deming: la revolución de la calidad y las herramientas de la estadística. *La Ciencia y El Hombre*, 13(1).

Onís González, E., Madariaga Torres, L., Varona Pérez, I., Gil Pérez, M., Moya Calderón, E., & Embid Pardo, P. (2017). Seguimiento de los resultados de microbiología y del tratamiento antibiótico empírico prescrito en un servicio de urgencias. *Pediatría de Atención Primaria*, 19(74).

Organization, W. H. Statistical aspects of microbiological criteria related to foods: A Risk Manager's Guide. vol. 24 (Food & Agriculture Org., 2019).

Ortega González, M., Rodríguez Martínez, C. C., & Zhurbenko, C. R. (2013). Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 51(1).

Ostos Ortiz, O. L., Rosas Arango, S. M., & González Devia, J. L. (2019). Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. *Nova*, 17(31). <https://doi.org/10.22490/24629448.3629>

Oteo, J., Bou, G., Chaves, F., & Oliver, A. (2017). Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(10). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.013>

Paisan, P., & Moret, P. (2010). La Repetibilidad Y Reproducibilidad En El Aseguramiento De La Calidad De Los Procesos De Medición. *Tecnología Química*, 30(2).

Pum, J. (2019). A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. In *Advances in Clinical Chemistry* (Vol. 90). <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.01.006>

Rueda Pereira, R. M. (2014). Presentación Vol.3(2). *Universitas (León): Revista Científica de La UNAN León*, 3(2). <https://doi.org/10.5377/universitas.v3i2.1684>

Sandoval, S. (2010). Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. *Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki*.

Singh, N., & Anand, S. (2021). Analytical methods: Microbiological. In *Encyclopedia of Dairy Sciences: Third edition* (Vol. 4). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.23005-9>

Wallace, P. S., & MacKay, W. G. (2013). Quality in the molecular microbiology laboratory. *Methods in Molecular Biology*, 943. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_3

Zurita, S. (2013). Procedimientos de Laboratorio. In *Instituto Nacional de Salud*.