

	<b>GUÍA DE VERIFICACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS DE AGUAS LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	1 de 29

*República de Colombia*




*Gobernación de Santander*

# GUÍA DE VERIFICACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS DE AGUAS

	<b>GUÍA DE VERIFICACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS DE AGUAS LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	2 de 29

## Tabla de contenido

1. Objetivo .....	3
2. Alcance .....	3
3. Terminología .....	3
4. Generalidades .....	6
5. Documentos aplicables .....	7
6. Desarrollo .....	7
6.1 Definir Verificación de acuerdo con el tipo de método .....	7
6.2. Definir el Diseño de la verificación .....	8
6.3 Verificación de métodos .....	11
6.3.1 Verificación métodos Cuantitativos. NMP .....	11
6.3.2 Verificación métodos Cualitativos Por Filtración por membrana .....	19
6.3.3 Verificación métodos Cuantitativos Por Filtración por membrana .....	24
7. Bibliografía .....	29
8. Control De Cambios .....	30

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	3 de 29

## 1. OBJETIVO

Establecer la metodología para demostrar que los requisitos especificados en un método son adecuados para el uso previsto o la obtención de evidencia objetiva con el fin de establecer que el método satisface los requisitos especificados en caso de una verificación de métodos microbiológicos cuantitativos y cualitativos en la matriz de agua de la Unidad de Vigilancia de Factores de Riesgo del Ambiente y del Consumo.

## 2. ALCANCE

Este documento incluye la selección del método a verificar, la estandarización del inóculo microbiano, los atributos a evaluar, los cálculos estadísticos para métodos microbiológicos cualitativos y cuantitativos, estimación de la incertidumbre y el informe de verificación en la matriz agua.

## 3. TERMINOLOGÍA

**Condición de precisión intermedia de una medición:** Condición de medición dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medición, el mismo lugar y mediciones repetidas del mismo objeto u objetos similares durante un periodo amplio de tiempo, pero no puede incluir otras condiciones que involucren variaciones. (VIM 2.22)


**Condición de Repetibilidad de una medición:** Condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodocorto de tiempo. (VIM 2.20)

**Condición de Reproducibilidad de una medición:** Condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye diferentes lugares, operadores, sistemas de medida y mediciones repetidas de los mismos objetos u objetos similares. (VIM 2.24)

**Exactitud de medida:** Proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando (VIM 2.13)

**Error de medida:** Diferencia entre un valor medido de una magnitud y un valor de referencia (VIM 2.16)

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	4 de 29

**Error sistemático de medida:** Componente del error de medida que, en mediciones repetidas, permanece constante o varía de manera predecible. (VIM 2.17)

**Error aleatorio de medida:** Componente del error de medida que, en mediciones repetidas, varía de manera impredecible. (VIM 2.19)

**Especificidad:** Es la capacidad del método para diferenciar precisa y específicamente el compuesto de interés, en presencia de los demás componentes, que se espera estén presentes en la matriz de la muestra. Estos componentes pueden ser precursores de la síntesis o subproductos de la misma, impurezas, excipientes o productos de degradación. (WHO Technical Report Series, No. 823, 1992).

**Estabilidad:** Se considera adecuada si la desviación estándar relativa calculada en los resultados obtenidos en diferentes intervalos de tiempo no excede el 20% del valor correspondiente de la precisión del sistema. (WHO Technical Report Series, No. 823, 1992)

**Exactitud de Medida:** Según el ítem 2.13 del VIM, Exactitud es el “Grado de concordancia entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando”.

**Incertidumbre de medida:** Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza. (VIM 2.26)

**Límite de detección:** Aplicado a análisis microbiológicos cualitativos. Número mínimo de microorganismos que pueden ser detectados, pero en cantidades que no pueden estimarse con precisión.


**Límite de cuantificación:** Corresponde a la más baja cantidad del analito que puede determinarse cuantitativamente con precisión y exactitud aceptables. (WHO Technical Report Series, No. 823, 1992).

**Material de referencia:** Material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas. (VIM 5.13)

**Material de referencia certificado:** Material de referencia acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos. (VIM 5.14)

**Mensurando:** Magnitud que se desea medir (VIM 2.3)

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	5 de 29

**Métodos cualitativos:** Método de análisis cuya respuesta es la presencia o ausencia del analito, detectado de forma directa o indirecta en cierta cantidad de muestra. (ISO 16140- 1:2016)

**Métodos cuantitativos:** 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 cierta cantidad de muestra. (ISO 16140-1:2016)

**Precisión de medida:** Proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas. (VIM 2.15)

**Robustez:** en un método es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos para las mismas muestras bajo variadas condiciones (diferentes experimentadores, diferentes lotes de reactivos). Se realiza un diseño experimental con varios factores y se aplica análisis de varianza. (Useche, B.)

**Sensibilidad:** Capacidad o habilidad del sistema tamiz de detectar muestras positivas cuando realmente son positivas

**Validación:** Verificación de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto. (VIM 2.45)

**Valor predictivo del test positivo:** Es la capacidad de una prueba de dar un resultado positivo evitando la inclusión de falsos positivos.

**Valor predictivo del test negativo:** Es la capacidad de una prueba de dar un resultado negativo evitando la inclusión de falsos negativos.

**Verificación:** Aportación de evidencia objetiva de que un elemento satisface los requisitos especificados. (VIM 2.44)

**Veracidad de medida:** Proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia. (VIM 2.14)

**Varianza:** Dato estadístico que muestra la extensión o dispersión de las puntuaciones en una distribución de estas. Se calcula sumando los cuadrados de las diferencias entre los distintos valores de una serie y la media aritmética de esa serie, y dividiendo la suma por el número de valores menos uno.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

La **prueba ANOVA** es una de las herramientas estadísticas más poderosas de las que disponemos al momento de analizar los datos obtenidos en el laboratorio, en especial para cuando queremos evaluar la precisión en la validación o verificación de un método; es un tipo de análisis estadístico que nos permite comparar dos o más medias obtenidas a partir de una serie de conjuntos de valores.

La prueba nos permite determinar si dentro de un conjunto de medias existen diferencias significativas entre ellas. Esto se realiza con un nivel de confianza preseleccionado, generalmente de 95%.


En este sentido, un factor podría ser por ejemplo los diferentes analistas que realizan el mismo ensayo. En este tipo de pruebas, por ejemplo, dos o más analistas llevan a cabo una serie de medidas repetidas bajo condiciones de repetibilidad.

A partir de los resultados obtenidos es posible obtener un valor promedio por cada analista. Es aquí donde la prueba resulta útil

#### 4. GENERALIDADES

- ✓ El proceso de verificación permite al laboratorio demostrar que el procedimiento analítico es apto para el propósito indicado y garantiza que los resultados generados son válidos y confiables.
- ✓ El laboratorio debe usar métodos y procedimientos apropiados dentro de su alcance para todos los ensayos.
- ✓ Los métodos que se verifican son métodos normalizados o métodos de organismos nacionales o internacionales reconocidos.
- ✓ Los procedimientos descritos en esta guía aplican para los diferentes tipos de técnicas microbiológicas cuantitativas, como lo es número más probable (NMP). Unidades formadoras de colonia (UFC) o para técnicas cualitativas como presencia – ausencia
- ✓ Las actividades de verificación se realizan con muestras de la matriz agua (agua para consumo humano, sin tratamiento o aguas de uso recreativo y estructuras similares) contaminadas con niveles de UFC o NMP de cepas de referencia certificadas.
- ✓ La ejecución del ensayo se debe hacer en una semana.
- ✓ El montaje del ensayo debe seguir estrictamente todos los pasos que dice la técnica.
- ✓ La escogencia de un método de verificación debe considerar la naturaleza de las

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	7 de 29

matrices, los análisis requeridos, los requisitos establecidos por la legislación y la facilidad con que el método puede ser aplicado en las condiciones existentes en el laboratorio.

- ✓ Los aspectos más relevantes, que afectan el proceso de verificación son: el analista, los instrumentos de medición, las instalaciones, las condiciones ambientales, las muestras, el material de referencia certificado.
- ✓ Para los ensayos en matriz agua se seguirá lo definido en la norma Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, de acuerdo con la metodología según los tipos de muestras que se analizan en el laboratorio.

## 5. DOCUMENTOS APLICABLES

- ✓ Diseño para la verificación de métodos de ensayo
- ✓ Informe de verificación y estimación de la Incertidumbre de métodos analíticos

## 6. DESARROLLO

Se debe tener en cuenta: si ese método es aplicable a la muestra a analizar, la cantidad de muestra necesaria para el ensayo, el límite inferior del método (para ensayos cuantitativos), si usando esta metodología se puede evaluar el cumplimiento de las exigencias requeridas para la muestra.


### 6.1 DEFINIR VERIFICACIÓN DE ACUERDO CON EL TIPO DE MÉTODO

El laboratorio debe verificar un método cuando:

- En el laboratorio se realiza una prueba por diferentes metodologías o diferentes plataformas.
- Cuando el laboratorio cambia de instalaciones
- Antes de introducir una nueva metodología

TIPO DE MÉTODO	MARCO CONCEPTUAL	APLICABILIDAD EN EL LABORATORIO	TIPO DE EJERCICIO DE VALIDACIÓN APLICABLE
NORMALIZADO	Son desarrollados por un organismo de normalización u otra organización reconocida, cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico en Cuestión	Básicamente corresponden a los ensayos cuya fuente (documento normativo que declara como se realiza el ensayo) se encuentra en las normas ISO (ensayos alimentos), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater(ensayos aguas, NTC)	Verificación

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	8 de 29

NO NORMALIZADOS	Pueden haber sido desarrollados por el propio laboratorio u otras partes o haber sido adaptados de métodos normalizados y validados	<b>Método normalizado modificado:</b> Serán aquellos métodos normalizados con variaciones de mayor o menor relevancia (cambios en su ejecución, utilización fuera de su alcance, etc.)	Validación con un grado de desarrollo que permita asegurar que los parámetros de funcionamiento obtenidos responden a los criterios establecidos en función de las necesidades de los clientes y que son adecuados al uso previsto.
NO NORMALIZADOS	Pueden haber sido desarrollados por el propio laboratorio u otras partes o haber sido adaptados de métodos normalizados y validados	<b>Método del fabricante:</b> Estos métodos Corresponden a los métodos del fabricante (métodos comerciales para identificación de microorganismos)	Verificación. Debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo o del campo de aplicación dados, con base en la disponibilidad de información de la validación primaria desarrollada por el fabricante o el aval que Organizaciones internacionales otorguen reconocimiento al método.
NO NORMALIZADOS	Pueden haber sido desarrollados por el propio laboratorio u otras partes o haber sido adaptados de métodos normalizados y validados	<b>Método desarrollado por el laboratorio:</b> Este escenario típicamente no se encuentra en un LSP, sin embargo, a efectos prácticos si se adoptara, implicará el desarrollo integral de un ejercicio de validación que permita demostrar la aptitud para el uso previsto	Validación

## 6.2. DEFINIR EL DISEÑO DE LA VERIFICACIÓN

Para definir el diseño, se debe diligenciar el formato “Diseño para la verificación de métodos de ensayo” con código compuesto por:

1. Formato de pre- validación (lista de chequeo) con los pre- requisitos necesarios para la verificación.
2. Formato de Diseño.


Estos incluyen la siguiente información:

**Propósito u objetivo:** El propósito es determinar la aptitud del método para: identificación, determinación, recuento etc. Ejemplo: Determinar la aptitud de las características y atributos para la determinación de Coliformes totales y *E. coli* en agua para consumo humano mediante la técnica de número más probable.

- Alcance:** Incluye la matriz y el analito
- Tipo de validación/ Verificación:** Especificar si es validación o verificación
- Referente de verificación:** Es la norma aplicable para la validación o verificación (ISO, AOAC,

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas



 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	9 de 29

etc). Ejemplo: ISO 13843 Calidad del agua – Requisitos para el establecimiento de las características de funcionamiento de los métodos microbiológicos cuantitativos.


- Referente normativo:** Es el documento de referencia, su fecha de edición o versión, la cual describe los pasos para desarrollar el ensayo.
- Tipo de método:** Cualitativo o cuantitativo
- Parámetros por verificar:** Corresponde a los atributos dependiendo del tipo de método y las herramientas estadísticas.

Ejemplo:

TIPO DE METODO	ATRIBUTO O PARAMETRO	HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS/ ESTADÍSTICAS	CUANDO SE UTILIZA
CUALITATIVO	Repetibilidad	Porcentaje de concordancia	El laboratorio utiliza "plenamente" un método normalizado
	Precisión intermedia	Índice kappa (típicamente empleado)	
	Reproducibilidad	cuando se pretende comparar dos metodologías analíticas o diferentes analistas)	
	Selectividad/especificidad	%especificidad	
	Selectividad/especificidad	% sensibilidad	
	Sensibilidad	% selectividad/especificidad	
	Exactitud	Intervalos de confianza	
	Falsos Positivos (FP)	Intervalos de confianza	
	Falsos Negativos (FN)	con base en tabla de contingencia 2 x 2	
	Eficiencia	LD	El método no normalizado o se ha desarrollado de forma interna en el laboratorio
Límite de detección	LC		

TIPO DE METODO	ATRIBUTO O PARAMETRO	HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS/ ESTADÍSTICAS	CUANDO SE UTILIZA
	Repetibilidad	Coeficiente de variación (%CV)	El laboratorio utiliza un método normalizado y/o se quiere aplicar a una nueva matriz
	Precisión intermedia	Desviación estándar relativa (RDS)	
	Exactitud	Porcentaje de recuperación (%RPD)	
	Efecto matriz	Annova	


Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>		CÓDIGO	MI-GS-GI-153
			VERSIÓN	0
			FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
			PÁGINA	10 de 29

CUANTITATIVO	límite de detección / límite de cuantificación	Cálculo por fórmula	
		Evidencia experimental de cumplimiento	
	Robustez	(Relación %CV vs concentración)	

- ✓ **Criterios de aceptación y rechazo:** Se definen las especificaciones de desempeño del método. Los criterios pueden corresponder a criterios definidos desde el método de ensayo u objetivos analíticos del laboratorio fundamentados en normatividad vigente y los requisitos del cliente. Si los criterios no están documentados, el objetivo del ejercicio será determinarlos.
- ✓ **Responsabilidad:** El coordinador del Laboratorio de Salud Pública con apoyo del líder técnico del área es responsable de la revisión final y emisión del informe de verificación.
- ✓ **Competencia del analista – Verificación:** Se evidencia en la evaluación de competencias con la supervisión directa, especificando el % de cumplimiento, según la evaluación de la competencia técnica del LSP y la autorización de desempeño de actividades.
- ✓ **Nombre del Método en el SIG:** Se indica el método analítico aplicado en el ensayo, con nombre completo y código
- ✓ **Pre-requisitos para el desarrollo de la verificación:** Corresponde a la lista de chequeo donde se verifica:
  - Documentación: Revisar la norma aplicable, el procedimiento de análisis que se va a verificar
  - Personal: demostración de competencia, experiencia en el ensayo, autorización para verificar.
  - Condiciones ambientales: Registro de control de temperatura, control de limpieza y desinfección, control de ambientes y superficies, registro de control de humedad relativa.
  - Equipos que intervienen en el proceso de verificación: Estado de las intervenciones metrológicas, registro uso de Equipos.
  - Reactivos, soluciones e insumos que se requieren para realizar la verificación.
  - Material de referencia certificado.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	11 de 29

- Tamaño y obtención de la muestra.
  - Materiales y otros insumos que se requieren para el proceso.
  - Elementos específicos de la metodología.
  - Condiciones particulares de la muestra: Características, almacenamiento
- ✓ **Etapas de pre – verificación:** Donde se especifica si el método a verificar es normalizado, etc.
  - ✓ **Verificación de métodos cuantitativos:** Se definen los parámetros a verificar, el diseño que se aplicará y los criterios de aceptación para cada parámetro.

### 6.3 VERIFICACION DE METODOS

#### 6.3.1 VERIFICACION METODOS CUANTITATIVOS. NMP

##### ESTANDARIZACIÓN DE LA CEPA

Para el ensayo preliminar de verificación se eligen las cepas de referencia según el método.

##### PREPARACIÓN DEL INOCULO

Con la cepa de referencia reconstituida, se debe hacer una suspensión de concentración de 100 millones de bacteria/mL aproximadamente, la siguiente preparación del inoculo.


En un frasco estéril tomar 20 mL de caldo nutritivo y/o BHI, se agrega la cepa de referencia seleccionada, se añade y se mezcla muy bien (con vortex o manualmente).

Incubar a 35± 0,5 (Determinación de Coliformes totales y E. coli, Heterótrofos) a 38° C ± 0.5° C (Pseudomona aeruginosa) durante 18 a 20 horas, pasado este tiempo las bacterias se encuentran en fase logarítmica.

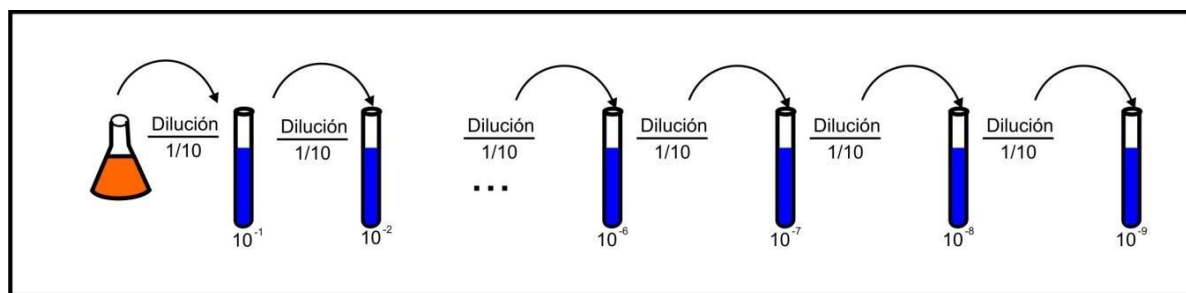
Teniendo las cepas en fase logarítmica, se realizaron diluciones seriadas base 10, en 9 frascos que contenían 90 ml de agua destilada estéril, marcados para cada dilución.

Al primer frasco se le agrega 10 ml del inóculo que contiene aproximadamente 100.000.000 de

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	12 de 29

bacterias/ml, mezclar muy bien. Esta dilución es del orden  $10^{-1}$  (su concentración puede estar entre 100.000.000 y 10.000.000 bacterias/ml), de éste dilución tomar 10 ml llevar al frasco # 2, la concentración es de  $10^{-2}$  (es decir, 10.000.000 y 1.000.000 de bacterias/ml), de aquí pasar 10 ml al frasco #3 (su concentración es de 1.000.000 a 100.000 bacterias/ml). De esta tomar 10 ml y adicionarlo al frasco #4, (su concentración es de 100.000 bacterias/ml a 10.000 bacterias/ml). De este pasar 10 ml al frasco #5, (su concentración es de 10.000 a 1000 bacterias/ml). De este tomar 10 ml y llevarlo al frasco # 6, (su concentración es de 1000 a 100 bacterias/ml). De aquí tomar 10 ml llevarlo al frasco # 7, (su concentración es de 100 a 10 bacterias/ml). Finalmente, tomar 10 ml y llevarlo al frasco # 8, (su concentración es de 10– 0 bacterias/ml).



Con 1 ml de las tres últimas diluciones  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  definidas como concentración alta, media y baja respectivamente, se inoculó en 99 ml de agua destilada estéril, teniendo en cuenta que en la Tecnología de sustrato definido y las bolsas Quanti-tray para el conteo en NMP, están diseñados para un análisis de muestra de 100 ml. Este procedimiento también se realizó en la dilución  $10^{-9}$  únicamente para verificación del posible crecimiento en una mínima concentración

Según estas diluciones las concentraciones teóricas y reales obtenidas son:


Concentración teórica y real de la cepa seleccionada para el ensayo de verificación

Dilución	Concentración teórica	Concentración obtenida
$10^{-6}$ .	100-1000 NMP/ml	748,9 NMP/ml
$10^{-7}$ .	10-100 NMP/ml	129,5 NMP/ml
$10^{-8}$ .	1-10 NPM/ml	10,7NMP/ml

Resultados estadísticos de la estandarización de la cepa de referencia seleccionada para el ensayo de verificación

Dilución	Media	DS	CV (%)
----------	-------	----	--------

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS  MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	13 de 29

10 <sup>-6</sup> .			
10 <sup>-7</sup> .			
10 <sup>-8</sup> .			

$$SD_{muestras} = \sqrt{\frac{\sum |x - \bar{x}|^2}{n - 1}}$$

$$CV = \frac{DS}{\bar{X}} \times 100$$

### VALORES MÁXIMOS Y MÍNIMOS EN SIEMBRA DIRECTA

Este valor se determina de acuerdo con la tabla IDEXX Quanti-Tray \*/2000, Número Más Probable, el cual viene junto con los reactivos de la técnica. Siendo el valor mínimo **1**, cuando el resultado de crecimiento se evidencia por el cambio de color de por lo menos uno de los pocillos grades o uno de los pocillos pequeños.

El valor máximo en siembra directa es **2419.6**, cuando el resultado de crecimiento positivo es 49 pocillos grandes y 48 pocillos pequeños. En caso de realizar diluciones el resultado del conteo debe ser multiplicado por el factor de dilución a la cual ha sido sometida la muestra (cuando se requiera realizar dilución a la muestra).

### VARIABLES VERIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA CUANTITATIVA

**Precisión:** Se expresa mediante desviación estándar, varianza y coeficiente


de variación bajo condiciones de:

Repetibilidad

Precisión Intermedia

### PROCEDIMIENTO DE REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN INTERMEDIA.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	14 de 29

Para determinar la Repetibilidad del método, se realizó el ensayo de la siguiente forma:

Se hace montaje de la muestra de la matriz seleccionada para verificar el recuento microbiano inicial ( agua para consumo humano, agua sin tratamiento, agua de piscina et)

El primer ensayo consiste en sembrar una misma muestra 12 veces, por un solo analista. El segundo ensayo consiste en sembrar la misma muestra 12 veces, por dos analistas diferentes. Este procedimiento, también fue usado para determinar la Precisión intermedia de la técnica.

Los datos obtenidos (datos primarios de la verificación de la técnica de Sustrato definido Colilert/ Pseudalert/ HPC) deben ser procesados estadísticamente en Log10, se determina el coeficiente de variación, la varianza para algunos casos puntuales, la media y la desviación estándar junto con el análisis de varianza de un factor para los ensayos entre analistas.

Utilizar para el análisis el cuadro en Excel con las siguientes variables para los resultados de caracterización de la cepa en agua destilada y en la matriz agua seleccionada, además para cada analista (Promedio, DS, Intervalo de confianza, Coeficiente de variación, RDS, RDS^2, Repetibilidad, Limite de repetibilidad)

#Replica	Coliformes Totales				E.coli			
	CG	CP	NMP	LOG NMP	CG	CP	NMP	LOG NMP
1 a 12				=Log( )				=Log( )

### Cálculo de Resultados:


Para calcular el índice de Repetibilidad y precisión intermedia (%R y PI) se utilizaron las siguientes fórmulas:

A partir de estos valores se determinó la Repetibilidad (RSDx) y Precisión intermedia (PI) del método NMP, para la técnica sustrato definido Colilert/ Pseudalert / HPC.

Los resultados estadísticos se presentan en tablas de Excel

$$RDS = \frac{DS}{\bar{X}}$$

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	15 de 29

$$PI = \sqrt{\frac{\sum RDS^2(A) + \sum RDS^2(B)}{n}}$$

Dónde:

**RSD** es la desviación estándar relativa de los datos

**N** es el número de datos analizados

**Repetibilidad**  $\sqrt{\frac{RDS^2}{n}}$

**Límite de repetibilidad**  $2,8 \times DS$

**% de Recuperación**  $Log \bar{X}(100)$

La fórmula para la determinación de los criterios del Límite de Repetibilidad es:

$$LR=CV \times Sr$$

$$LR=2.8 \times Sr$$

Donde *Sr* es la desviación estándar de la repetibilidad

La fórmula para la determinación de los criterios del Límite de precisión es:

$$LR=CV \times SR$$

$$LR=2.8 \times SR$$


Donde *SR* corresponde a la desviación estándar de los dos analistas *SL* y la desviación estándar de la precisión intermedia *Sr*

$$SR= \sqrt{S^2_L + S^2_r}$$

## CALCULO DE LA INCERTIDUMBRE

Los cálculos se realizan en la escala logarítmica común. Para cada muestra, se realizan dos análisis y

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

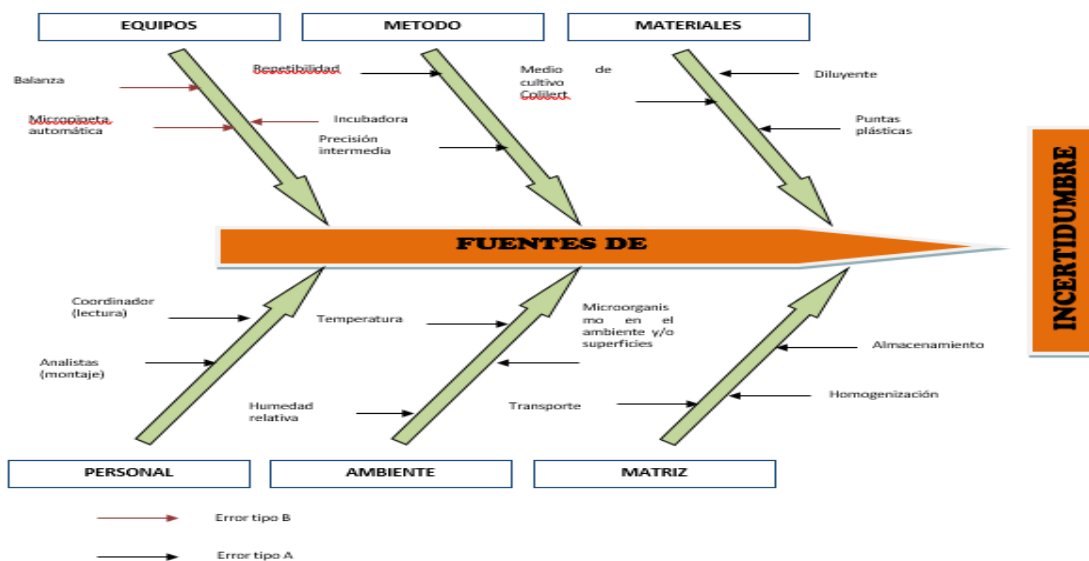
	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	16 de 29

se obtienen por cada analista. Una estimación de la varianza de reproducibilidad intralaboratorio puede ser calculada a partir de los resultados.

El cálculo en escala logarítmica asegura que el valor del parámetro no es sensible al nivel de contaminación (dilución). Por lo tanto, se puede calcular a partir de los recuentos originales.


Las fuentes de incertidumbre identificadas para el método se encuentran asociadas a:

- Distribución de los microorganismos en las muestras (distribución de Poisson)
- Efectos de matriz
- Analistas que ejecutan los ensayos
- Mediciones (pesadas o medición de la muestra)
- Diluciones
- Homogenización de la muestra
- Calidad de los medios de cultivo
- Tiempo hasta la inoculación
- Temperatura de incubación
- Instrumentos volumétricos



Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas



	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	17 de 29

Para la estimación de la Incertidumbre, el mensurando definido fue: NMP de (Coliformes totales y *E. coli*; *P. aeruginosa* y/o heterótrofos) en matrices de aguas de consumo humano, aguas sin tratamiento, uso recreativo y estructuras similares; el modelo matemático no aplica ya que se trata de un método microbiológico que se comporta con distribución de Poisson.

Se usa logaritmo en base 10 de los recuentos obtenidos para dar linealidad a los datos y aplicar las fórmulas.

Los errores tipo A están contemplados en el estudio de validación dentro del cálculo de repetibilidad *r* y precisión intermedia *R*.

Se desestima la incertidumbre del indicador de la incubadora debido a que este instrumento no es de medición, su función es proporcionar una condición ambiental para el desarrollo de los microorganismos. Sin embargo, su control se incluye en el programa de aseguramiento metrológico para garantizar el proceso de incubación.

Los componentes de incertidumbre originados en el ambiente, personal, matriz, materiales se encuentran contemplados en la evaluación de la repetibilidad y precisión intermedia, puesto que durante el estudio de confirmación y el proceso rutinario se controlan internamente con diferentes pruebas incluidas en el cronograma de controles interno y aseguramiento de la calidad de los resultados.

El sesgo no se incluye en la estimación de la incertidumbre, pero se controla con las calibraciones de los equipos (balanza, micropipetas) y se monitorea en las participaciones en interlaboratorios.

Cualquier otro componente diferente a los identificados que aporte incertidumbre al resultado del ensayo, queda cubierto por la estimación de la incertidumbre expandida con un factor de cobertura  $k=2$ .

La incertidumbre expandida (*U*), se calcula a partir de la desviación estándar de la muestra (*S*) del ensayo de Repetibilidad y de precisión intermedia el número de datos procesados (*n*), y se utiliza la siguiente fórmula:


**INCERTIDUMBRE COMBINADA (*U<sub>c</sub>*):** es la raíz de las varianzas totales

$$U_c = \sqrt{S_r^2 + S_R^2}$$

Desviación estándar repetibilidad: promedio de las desviaciones estándar de repetibilidad del analista 1 en la dilución de conteo para todas las matrices y ambos microorganismos:

**(Coliformes totales y *E. coli*) / *Pseudomona aeruginosa* y/o heterótrofos**

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	18 de 29

Sr = Desviación estándar precisión intermedia: promedio de las desviaciones estándar de precisión intermedia en la dilución de conteo para todas las matrices y ambos microorganismos:

$$SR =$$

$$Uc = \sqrt{Sr^2 + SR^2} =$$

$$Uc =$$

**INCERTIDUMBRE EXPANDIDA (Ue):** es la incertidumbre total Uc multiplicada por el factor k = 2.

$$Ue = Uc \times k$$

Donde K=2 para un 95% de confianza

$$Ue =$$

## MESURANDO

El mesurando que es la unidad de medición es NMP/100 mL por lo cual la incertidumbre se expresa en esta unidad.

### Declaración de aptitud

Determinar si los procedimientos analíticos son conformes y adecuados para el uso previsto en el Laboratorio de Salud Pública de Santander.

La incertidumbre se obtiene a partir de los límites de confianza establecidos en las tablas de número más probable. Se tiene en cuenta el límite superior y el límite inferior a un 95% de confianza, lo cual equivale al rango en el cual se encuentra el resultado.


## INFORME DE VERIFICACIÓN

Para el desarrollo del informe de validación se utilizará el formato: Informe de Verificación y Estimación de La Incertidumbre de Métodos Analíticos.

### 6.3.2 VERIFICACION METODOS CUALITATIVOS POR FILTRACION POR MEMBRANA

Para su determinación se tienen como referencia el método normalizado descrito por APHA, AWWA,

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	19 de 29

WEF (2017): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. numeral 9260H. Los parámetros de verificación determinados son límite de detección, sensibilidad, selectividad/especificidad, tasa de negativos y positivos, precisión, exactitud e incertidumbre, aplicables a métodos de tipo cualitativo.

### Viabilidad y pureza de la cepa de trabajo

La cepa de trabajo es la cepa de referencia seleccionada de *Vibrio parahemolyticus* ATCC 17802, la cual se somete a las respectivas pruebas de viabilidad y pureza en el laboratorio, con el fin de confirmar las características típicas de su especie y que fuera viable para ser empleada en el proceso de verificación. Las pruebas realizadas son: crecimiento en medio de cultivo agar selectivo Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), acompañada de pruebas de cuerda y Oxidasa. Se pueden realizar pruebas bioquímicas de identificación estandarizadas.

### Verificación del método

Se evalúa los parámetros límite de detección, sensibilidad, selectividad/especificidad, tasa de negativos y positivos, precisión, exactitud e incertidumbre, aplicables a métodos de tipo cualitativo. Para ello, se preparó una suspensión bacteriana, utilizando diluciones seriadas, partiendo de una concentración conocida de células, teniendo en cuenta el estándar de turbidez de McFarland tubo # 1. Las suspensiones se realizaron en agua previamente esterilizada, para el caso de los parámetros límite de detección y el desarrollo de la curva de crecimiento.

### Límite de detección

#### Método de filtración por membrana en la detección de *Vibrio* spp.


Una vez determinados los parámetros de la caracterización de la cepa, se procedió a la aplicación del método descrito en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 9260H. Se utilizó una dilución de  $10^{-8}$  producto de la suspensión anteriormente mencionada. Para ello se realizaron 11 réplicas de dicha dilución, las cuales fueron filtradas utilizando filtros estériles de nitrocelulosa con tamaño de poro 0.45  $\mu\text{m}$ , con 47 mm de diámetro y, posteriormente, sembrados en agar TCBS e incubados a temperatura de 36.0 °C durante 18 a 24 horas.

Los dos analistas realizan el procedimiento y se diligencia en la tabla, por ej

Límite de detección determinado por dos analistas.

Límite de cuantificación			
#	Dilución base 10	1 UFC*	1 UFC
		Analista1	Analista2
1	-8	Presencia	Ausencia
2	-8	Presencia	Presencia

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	20 de 29

3	-8	Ausencia	Presencia
4	-8	Presencia	Presencia
5	-8	Presencia	Presencia
6	-8	Presencia	Presencia
7	-8	Presencia	Ausencia
8	-8	Presencia	Presencia
9	-8	Presencia	Presencia
10	-8	Presencia	Presencia
11	-8	Presencia	Presencia
# datos Presencia		10	9
# datos Ausencia		1	2
Promedio dato esperado (presencia)		9.5	
Promedio dato no esperado		1.5	
%		95 %	
Debe ser >90 %			

\* Unidades formadoras de colonia (UFC).

### Determinación parámetros de rendimiento del método


Son considerados los parámetros de precisión (concordancia), sensibilidad, especificidad/ selectividad, exactitud relativa, tasa de falsos positivos y negativos (SEIMC, 2013). Para su análisis se prepararon suspensiones en la dilución  $10^{-7}$  (para la cepa de trabajo corresponde a una concentración de 16 UFC/100mL). Seguido a ello, se realizó la filtración por membrana en filtros de nitrato de celulosa, con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  de 7 muestras, las cuales posteriormente fueron sembradas en agar selectivo TCBS para determinar las cepas presuntivas positivas de *Vibrio spp.* Asimismo, se procesaron 7 muestras que se sembraron en cromo agar para el aislamiento de *E. coli* como control negativo, siendo el recuento negativo.

Posteriormente, se incubaron las cajas de petri por un periodo de 18 a 24 horas a 36.0 °C para el caso de *Vibrio spp* a 35 °C para *E. coli*. Una vez cumplido el tiempo de incubación se realizó el recuento y se diligenció la matriz 2x2 (Tabla 2x2).

Matriz de 2x2 o tabla de contingencia para los datos de tasa de falsos positivos y negativos.

	Conteo presuntivo	
Conteo confirmado	Positivo (+)	Negativo (-)
Presuntivo (+)	a	b

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	21 de 29

Presuntivo (-)	c	D
----------------	---	---

En donde,

a: verdaderos positivos b: falsos negativos

c: falsos positivos

d: verdaderos negativos

Una vez se obtuvieron los datos, se utilizaron las ecuaciones descritas en la Tabla 2 para la determinación de los parámetros de la verificación.


**Tabla Relación** de parámetros de validación a determinar y sus ecuaciones.

<b>Parámetro de precisión (concordancia)</b>  $k = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$	<b>Parámetro de sensibilidad</b>  $\text{Sensibilidad \%} = \frac{a}{a + b} * 100$
<p>Donde,  <math>P_o = (a+d)/n</math>  <math>P_e = [(c*(a+c)) + ((a+b)*(b+d))]/n^2</math></p>	
<b>Parámetro de especificidad/selectividad</b>  $\text{Especificidad \%} = \frac{d}{c + d} * 100$	<b>Parámetro de exactitud relativa</b>  $\text{Exactitud relativa \%} = \frac{a + d}{n} * 100$
<b>Parámetro tasa de falsos positivos</b>  $\text{Tasa de falsos positivos \%} = \frac{c}{a + c} * 100$	<b>Parámetro tasa de falsos negativos</b>  $\text{Tasa de falsos negativos \%} = \frac{b}{b + d} * 100$

## Robustez

El ensayo se llevó a cabo teniendo en cuenta el tiempo de incubación de la etapa de enriquecimiento (6-8 horas) de *Vibrio spp.* a una temperatura de 36.0 °C. El ensayo consistió en evaluar dos tiempos de enriquecimiento de 6 y 18 horas, con la finalidad de verificar si existía alguna diferencia en la concentración del microorganismo objeto de estudio con esta variación. Para determinar si existían diferencias significativas entre los tiempos evaluados, se realizó una prueba de

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	22 de 29

ANOVA que corresponde a comparar la varianza de las medias entre cada uno de los grupos de datos a evaluar, siendo significativo cuando el valor p es mayor a 0.050. Este análisis se realizó utilizando el programa estadístico MiniTAB 19.20.

### Incertidumbre

Para determinar la incertidumbre expandida (Eurachem, 2015), definida como un valor que representa la dispersión de los datos, se calcula teniendo en cuenta inicialmente el valor de la incertidumbre estándar y estándar combinada, la cual involucra las incertidumbres de los equipos, materiales, reactivos y operario que participan en la validación. Para el caso de equipos, materiales y reactivos, se toma la incertidumbre de los certificados de calibración y de análisis, según corresponda. La incertidumbre del operario se puede tener en cuenta con el coeficiente de variación que se deriva de los ensayos de repetibilidad. Una vez se cuenta con estos datos, se calcula la incertidumbre expandida con la siguiente ecuación:

$$xU = \mu_c(y) * k \quad \text{(Ecu. 1)}$$

En donde,

$\mu_c(y)$ : incertidumbre estándar combinada.

k: Factor de cobertura = 2 (nivel de confianza del 95 %).

$$4RDS = \frac{DS}{\bar{X}}$$

$$PI = \sqrt{\frac{\sum RDS^2_A + \sum RDS^2_B}{n}}$$

Dónde:

**RSD** es la desviación estándar relativa de los datos

**N** es el número de datos analizados

Cálculo de resultados

**TABLA DE CONTINGENCIA:** A partir de esta tabla, se pueden obtener los resultados de los siguientes parámetros: Sensibilidad, Especificidad, Eficiencia, valor predictivo del test positivo (VPP), valor predictivo del test negativo (VPN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN)

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

Ejemplo: Método de referencia

	+	-	
Test	30 (a)	0 (b)	+
	0 ©	30 (d)	-

a	30	
SENSIBILIDAD= $\frac{\text{positivos}=0a+c}{\text{positivos}=0a+c} \times 100$	= $\frac{30}{30} \times 100=100\%$	Falsos VPP= 100%
d	30	
ESPECIFICIDAD= $\frac{\text{negativos}=0d+b}{\text{negativos}=0d+b} \times 100$	= $\frac{30}{30} \times 100=100\%$	Falsos VPN= 100%
a+d	60	
EFICIENCIA = $\frac{a+d}{N} \times 100$	= $\frac{60}{60} \times 100=100\%$	

### INFORME DE VERIFICACIÓN

- Para el desarrollo del informe de validación se utilizará el formato: Informe de Verificación y Estimación de La Incertidumbre de Métodos Analíticos.


### 6.3.3 VERIFICACION METODOS CUANTITATIVOS POR FILTRACION POR MEMBRANA

#### ESTANDARIZACIÓN DE LA CEPA

Se debe realizar antes del proceso de verificación, con el fin de lograr la estandarización del inóculo a utilizar.

- A partir de las cepas de trabajo, sembrar una perla en agar plate count o agar Nutritivo a temperatura de incubación de 18 a 24 horas dependiendo del microorganismo, a 35°C± 2°C para microorganismos

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	24 de 29

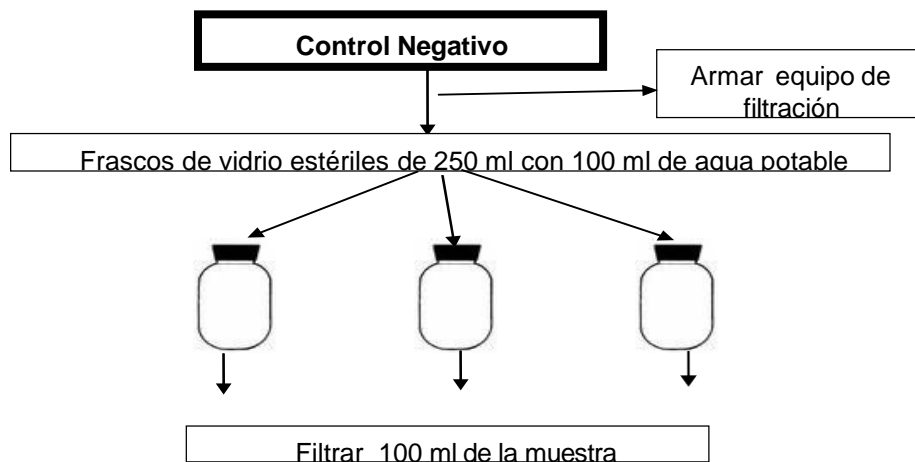
mesófilos y/o coliformes totales y E. coli.

- Cumplida la incubación, preparara una suspensión en 10 ml de caldo BHI a partir de 1,2 o 3 colonias, dependiendo el tamaño de estas, mezclar en vortex.
- Incubar a por 18-24 horas de  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  para microorganismos mesófilos, coliformes totales y E. coli
- En agua peptonada al 0.1% realizar diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$ . La suspensión  $10^{-1}$  contendrá aproximadamente 1 a  $2 \times 10^8$  UFC/ml de la cepa de referencia elegida.
- Se siembra a la par por profundidad 1 ml en agar Plate Count desde la dilución  $10^{-1}$  hasta la  $10^{-10}$  por duplicado y se incuban  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.
- Hacer el recuento y promediar con el fin de obtener 1UFC y máximo 3 UFC en la dilución  $10^{-8}$  para la fortificación de las muestras

### Prueba estándar proceso filtración

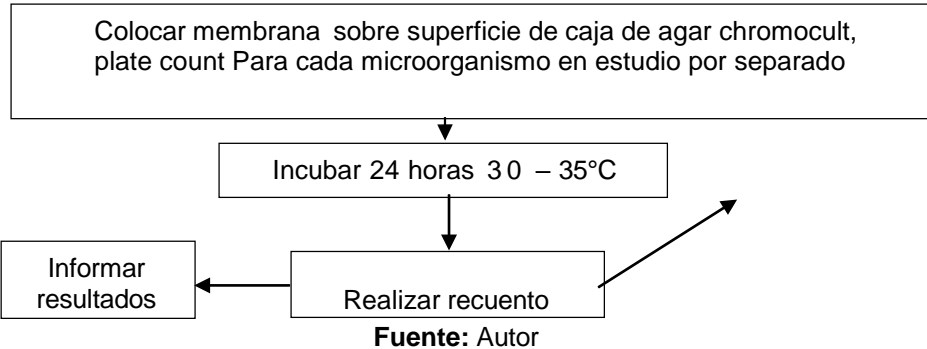
Para la prueba estándar, a 100 ml de agua estéril se adiciona 1 ml de la dilución  $3 \times 10^{-8}$  (30 UFC/ml) para cada uno de los microorganismos utilizados (según el método a verificar) : *Klebsiella variicola* ATCC 31488, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922 , para cada microorganismo por separado; seguidamente se filtra y se coloca la membrana sobre la superficie de agar plate count, se lleva a incubar durante 24 horas a una temperatura entre  $30-35^{\circ}\text{C}$  (según el método a verificar), luego de este tiempo se realiza el recuento, se evidencian las características típicas de crecimiento ; este procedimiento se realiza por triplicad

Diagrama de flujo del control negativo



Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

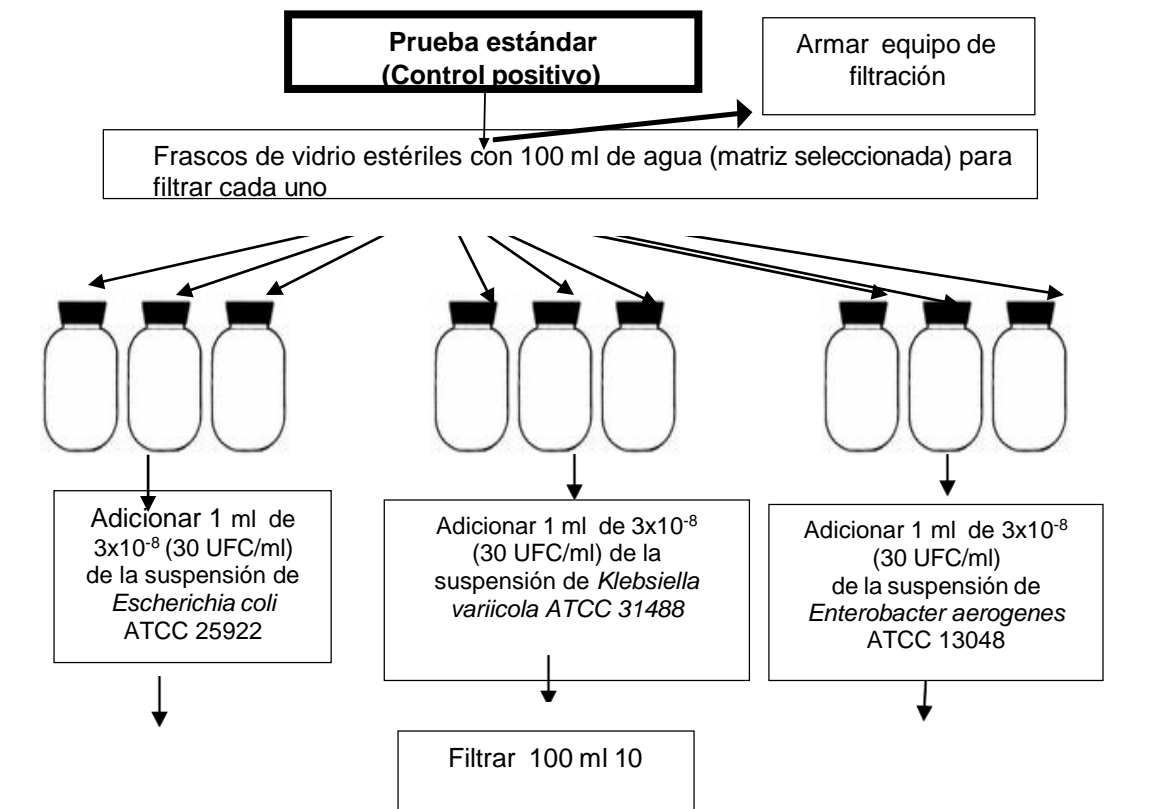





### Prueba estándar

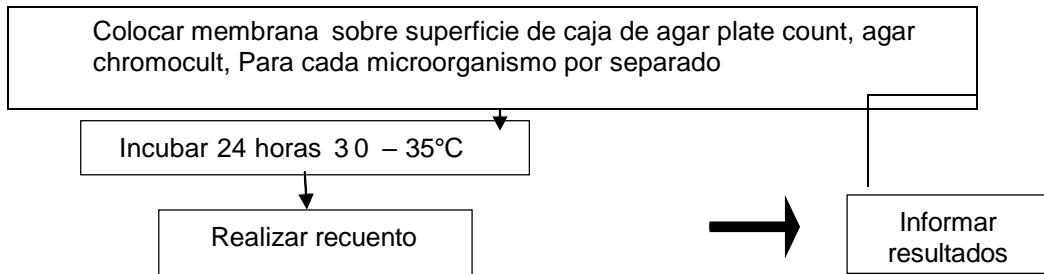
Para la prueba estándar, a 100 ml de agua de consumo humano, agua sin tratamiento y/o agua de uso recreativo se adiciona 1 ml de la dilución  $3 \times 10^{-8}$  (30 UFC/ml) para cada uno de los microorganismos seleccionados según el método a verificar.

### Diagrama de flujo de la prueba estándar



Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	26 de 29



Fuente: Autor

### Análisis de datos

Los datos de los recuentos se analizan según la media y desviación estándar.

#### Media. ( $\bar{x}$ )

Se define como un valor representativo de una serie de mediciones de un parámetro determinado. Estas mediciones deben ser tomadas bajo las mismas condiciones de modo tal que el valor resultante represente en forma objetiva dicho parámetro. Este concepto señala la tendencia de centralización de los datos con respecto al valor nominal de la especificación. (Montgomery, 1991)

Numéricamente se obtiene el coeficiente entre la sumatoria de todos los valores de la serie y el número total de mediciones, es decir

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n a_i}{n} = \frac{a_1 + \dots + a_n}{n}$$

$\Sigma$ = sumatoria

=  $\bar{x}$  media


N = número de elementos X =

valores o datos

#### Desviación Estándar ( $\sigma$ )

Es una medida de la dispersión de una serie de mediciones de un determinado parámetro, esto significa que no es un indicador de la variación entre cada valor y la media, se visualizan mejor cuando se presentan los datos en forma de una distribución de Frecuencia, es decir,

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	27 de 29

ordenados por clase según su magnitud (Montgomery. 1991)

Numéricamente la desviación estándar se obtiene de la raíz cuadrada de la sumatoria de todas los N cuadrados de la diferencia entre cada valor de una serie y su media, dividido por el número total de mediciones, es decir:

$$\sqrt{\bar{x}^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{x})^2}{N}}$$

Σ: sumatoria

X: valor de la serie

Media

N: número total de mediciones

## RESULTADOS


Estandarización de inóculos

Prueba	microorganismo	Tubo #	DILUCION	Recuento UFC/ml Replica 1	Recuento UFC/ml Replica 2
<b>1 a 10</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	4	3x10 <sup>-7</sup>	(n) x10=	(n) x10=
		5	3x10 <sup>-8</sup>	(n)x10=	(n)x10=
	<i>Klebsiella variicola</i> ATCC 31488	4	3x10 <sup>-7</sup>	(n) x10=	(n) x10=
		5	3x10 <sup>-8</sup>	(n)x10=	(n)x10=
	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	4	3x10 <sup>-7</sup>	(n) x10=	(n) x10=
		5	3x10 <sup>-8</sup>	(n)x10=	(n)x10=

**Control negativo (analista 1 y otra tabla para analista 2)**

Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>						CÓDIGO		MI-GS-GI-153	
							VERSIÓN		0	
							FECHA DE APROBACIÓN		28/06/2023	
							PÁGINA		28 de 29	
Recuentos UFC/100ml										


## INFORME DE VERIFICACIÓN

- Para el desarrollo del informe de validación se utilizará el formato: Informe de Verificación y Estimación de La Incertidumbre de Métodos Analíticos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Bqca. QM Alicis I. Cuesta, Consultora Internacional de la FAO. Validación de los métodos microbiológicos. Protocolo de Validación.
- MUÑOZ, Ana Isabel. OTERO Ligia. Guía de aseguramiento de la calidad, valoración de medios de cultivo y validación microbiológica cualitativa para los Laboratorios de Microbiología de Alimentos. INVIMA
- International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM) 3rd edition 2012: 2008 version with minor corrections.
- ISO 13843:2017-06. Water Quality – Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods.
- ISO 19036:2020. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.
- ISO 29201: 2012 Water Quality – The Variability of Test Results and the Uncertainty of a Measurement of Microbiological Enumeration Methods.
- APHA. AWWA. WPCF. 2017, 9223; “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” 23th edition; United States of America; p.p. 9-72, 9-73.
- ISO/TS 11133-2: 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media. Part 2: Practical Guideliness on Performance Testing of Culture Media.
- MADIGAN, M., J. MARTINKO y J. PARKER. 1998. Brock. Biología de los

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas

	<b>GUIA DE VERIFICACION DE METODOS MICROBIOLÓGICOS</b> <b>Laboratorio de Salud Pública.</b>	CÓDIGO	MI-GS-GI-153
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	28/06/2023
		PÁGINA	29 de 29

microorganismos. 8ª edición; Ed. Prentice Hall, España.

- Elisa Marcela Carrillo Zapata Aura María Lozano Caicedo. Validación del Método de detección de Coliformes totales y fecales en Agua Potable utilizando Agar Chromocult. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Carrera de Microbiología Industrial Bogota D.C. Diciembre De 2008. Autor

## 8.CONTROL DE CAMBIOS

CONTROL DE CAMBIOS				
VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	REVISÓ	APROBÓ
0	28/06/2023	Emisión inicial del documento	Alba Rocío Orduz Amézquita <b>Líder Grupo LDSP</b>  German Eduardo Marín Cárdenas <b>Director de Salud Integral</b>  Diego Sánchez Báez <b>Coordinador Grupo de Apoyo a la Gestión y Calidad</b>  César Ernesto Sánchez Aranda <b>Director de Planeación y Mejoramiento en Salud</b>	Javier Alonso Villamizar Suarez <b>Secretario de Salud de Santander</b>

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Vianey Emilce Portilla	Vianey Emilce Portilla	Alejandra Galvis Vargas