


aoxlab	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos

AOXLAB S.A.S.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

DOCUMENTO CONTROLADO


PROC-TC-012 Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos

Copia controlada No.: 1


	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Dario Pardo Pardo	Director de validaciones		2024-08-29
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Directora de Calidad		2024-08-30
Aprobó:	Jonatan Zárate Álvarez	Directora Técnica		2024-09-02
Localización del documento:	Plataforma SGC			

Control de Cambios--

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2017/08/01	1	Ninguno (versión original).	WFRP	YELP	YELP
Obsoleto	2018-11-17	2	Se adicionó el procedimiento para la evaluación de la linealidad en métodos de ensayo microbiológicos	WFRP	DPP	YELP
Obsoleto	2020-06-16	3	Se ampliaron las directrices para la validación de métodos microbiológicos	JCVG	DPP	YELP
Obsoleto	2021-02-12	4	Se corrigieron errores de redacción se cambió el concepto "confirmación" por "verificación"	JCVG	DPP	YELP
Obsoleto	2021-08-30	5	Se ajusta el procedimiento de validación de métodos microbiológicos, de acuerdo con la norma ISO 16140-3:2021 Se documenta la directriz de identificar y manejar riesgos asociados a los ejercicios de validación / verificación	JCVG	DPP	YELP


	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Obsoleto	2023-05-16	6	Se detalla el procedimiento para implementar el plan de verificación Se documenta el procedimiento para elaborar el calendario de verificaciones Se documenta el uso de las herramientas informáticas SOFT-TC-078 y SOFT-TC-079	DPP	AAPP	DPP
Obsoleto	2024-01-12	7	Se incorpora la directriz de realizar la verificación de la implementación de métodos microbiológicos de recuento en el mismo número de categorías de alimentos en las cuales se validó originalmente el método analítico	DPP	AAPP	LSGF
Obsoleto	2024-07-19	8	Se incorpora la tabla que detalla el número de cultivos a emplear en la verificación de la implementación de métodos microbiológicos. Se corrigen errores de redacción.	DPP	AAPP	LSGF
Vigente	2024-09-02	9	Se añadió un proceso de verificación y validación riguroso para modificaciones y adiciones en el marco del alcance flexible, asegurando el cumplimiento de criterios de competencia y la conformidad con los límites aprobados por ONAC.	DPP	AAPP	JOZA


	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE.....	6
1.1. Objetivo.....	6
1.2. Alcance.....	6
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	6
2.1. Definiciones.....	6
2.2. Notaciones.....	9
3. REFERENCIAS.....	10
4. DESARROLLO.....	11
4.1. SELECCIÓN, MONTAJE Y ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO.....	11
4.1.1. Selección de métodos de ensayo.....	11
4.1.2. Montaje y estandarización de métodos analíticos.....	13
4.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE VALIDACIÓN / VERIFICACIÓN.....	13
4.3. Atributos o características a evaluar en los métodos analíticos fisicoquímicos.....	15
4.3.1. Límites de detección y cuantificación.....	15
4.3.2. Intervalo de trabajo.....	17
4.3.3. Precisión.....	22
4.3.4. Veracidad.....	25
4.3.5. Selectividad.....	28
4.3.6. Robustez.....	29
4.3.7. Estimación de la incertidumbre.....	31
4.4. Atributos o características a evaluar en los métodos analíticos microbiológicos cualitativos para la industria de alimentos.....	31
4.4.1. Generalidades.....	31
4.4.2. Requerimiento para la implementación de la validación.....	33
4.4.3. Características de desempeño.....	34
4.5. Atributos o características a evaluar en los métodos analíticos microbiológicos cuantitativos.....	42
4.5.1. Determinación de la reproducibilidad intralaboratorio.....	42
4.5.2. Determinación de la exactitud.....	48
4.5.3. Métodos alternativos validados de confirmación y tipificación.....	51
4.6. Atributos o características a evaluar en los métodos analíticos microbiológicos. Cualitativos para industrias diferentes a alimentos.....	54

	<p>Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos</p> <p>AOXLAB S.A.S.</p>	<p>Identificación: PROC-TC-012</p>
		<p>Revisión: 9</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2024-09-02</p>

4.6.1.	Determinación de la sensibilidad, especificidad, eficiencia, selectividad y tasas de falsos positivos y de falsos negativos	54
4.6.2.	Límite de detección e intervalo de trabajo	57
4.6.3.	Linealidad	59
4.6.4.	Precisión	60
4.6.5.	Veracidad	62
4.6.6.	Robustez	62
4.6.7.	Estimación de la incertidumbre	62
4.7.	Establecimiento del plan de validación o verificación	63
4.8.	Especificación de los requisitos del método a validar	64
4.9.	Manejo de riesgos	64
4.10.	Informe de validación o verificación	65
4.11.	Verificación de cumplimiento de parámetros o características de validación	66
4.12.	Conclusiones de la validación	66
4.13.	Revalidación o reverificación de los métodos de ensayo	66
5.	RESPONSABILIDADES	67
5.1.	Director de Calidad	67
5.2.	Director Técnico	67
5.3.	Director de Validaciones	67
5.4.	Líder de Laboratorio	67
5.5.	Analistas	67
6.	DOCUMENTOS RELACIONADOS	67
7.	ANEXOS	69

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1. Objetivo.

Describir los pasos para realizar la validación o verificación de un método analítico atendiendo los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 [1].

1.2. Alcance.

Aplica para los ensayos microbiológicos y fisicoquímicos implementados en el laboratorio.

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1. Definiciones.

Alcance de aplicación de laboratorio [9]

Categorías, matrices, analitos y concentraciones para un método analítico que un laboratorio afirma ser capaz de realizar pruebas satisfactorias.

Alcance de la validación [9]

Categorías, matrices, analitos y concentraciones para las que se puede utilizar satisfactoriamente un método de análisis validado.

Analito [6].

Componente de un sistema a ser medido químicamente.

Blanco [6].

Material que es similar en matriz y estado físico de preparación a las muestras que están siendo analizadas como muestras problema, pero que no contiene el analito nativo y que es usado con el propósito de dar seguimiento a diferentes aspectos del proceso analítico.

Categoría de alimento [9].

Grupo de categorías de alimento del mismo origen.

Cepa no objetivo [9]

Cepa, definida de acuerdo con el alcance del método de referencia que no se esperaría razonablemente ser confirmada, detectada o enumerada por el método

Cepa objetivo [9]

cepa, definida según el alcance del método de referencia, que se espera confirmar, detectada o enumerada por el método


Documento [2].

Información y su medio de soporte.

Ensayo/prueba [2].

Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento.

Exactitud [3].

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando.

Exactitud [9].

Estimación de un error de medición sistemático, o la diferencia sistemática entre el valor cuantitativo

Incertidumbre [3].

Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza.

Intervalo de trabajo [6].

Intervalo de concentraciones analíticas o los valores de las propiedades sobre las cuales el método va a ser aplicado. Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal. Dentro de este intervalo lineal de respuesta habrá una relación lineal con la concentración del analito.

Ítem [9]

Matriz de producción primaria, ambiental o de alimentos, piensos, ambiental o especificada única

Límite de cuantificación [6].

Concentración mínima del analito en una muestra que puede determinarse con un nivel de incertidumbre aceptable, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de detección [6].

Mínima concentración de un analito o sustancia en una muestra, la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones en que se lleva a cabo el método.

LOD₅₀ [9].

nivel de detección al 50% de probabilidad de detección.

LOD₅₀ estimado [9]

Determinación del LOD50 basado en el diseño experimental descrito en este documento.

Material de referencia certificado [3].

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.


Matriz [9]

Todos los componentes de la muestra

Método de medida [3]

Descripción genérica de la secuencia lógica de operaciones utilizadas en una medición

Muestra de laboratorio [9]

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Muestra preparada para enviar al laboratorio y destinada a inspección o ensayo.

Muestra de ensayo [9]

Muestra preparada a partir de la muestra de laboratorio de acuerdo con el procedimiento especificado en el método de prueba y de la cual se toman las porciones de prueba

Porción de ensayo [9]

Muestra representativa medida (volumen o masa) tomada de la muestra de laboratorio para su uso en la preparación de la suspensión inicial.

Precisión [3].

Proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas.

Procedimiento [2].

Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso.

Recuperación [6].

Proporción del analito presente o adicionado a una muestra que sirve para evaluar la eficiencia del método de ensayo.

Repetibilidad [3].

Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad.

Reproducibilidad [3].

Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad

Robustez [6].

Medida de la capacidad de un método de ensayo de permanecer inalterado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.

Selectividad [6].

Capacidad de un método para determinar exacta y específicamente un analito de interés en presencia de otros componentes en la matriz bajo las condiciones de ensayos establecidos y puede ser:


Cualitativa: el grado en el cuál otras sustancias interfieren con la determinación de una sustancia de acuerdo con un procedimiento dado y/o

Cuantitativa: un término usado en conjunto con otros términos (por ejemplo: constante, coeficiente, índice, factor, número) para la caracterización cuantitativa de interferencias.

Tipo de alimento [9]

Para una categoría de alimento dada, un grupo de artículos (alimentos) procesados de manera similar, con características intrínsecas similares y una ecología microbiana similar

Sensibilidad [6].

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

La pendiente de la curva de calibración. Si la curva es efectivamente una "curva", en lugar de ser una línea recta, entonces la sensibilidad será una función de la cantidad o concentración del analito.

Sesgo [6].

Medida del error sistemático de un procedimiento analítico dado y es la desviación, positiva o negativa, de la media de los resultados analíticos con respecto al valor convencionalmente verdadero.

Validación [2].

Verificación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.

Verificación [2].

Verificación, a través de la aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos especificados.

Veracidad [3].

Proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia.

2.2. Notaciones.


Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

"Laboratorio": Se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S

"Servicios": para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.


"Ítem": se refiere al elemento o material bajo ensayo.

"Validación" se refiere a los ejercicios de validación o verificación de métodos de ensayo

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

3. REFERENCIAS.

- [1] ISO/IEC. (2017). 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories / Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- [2] ISO. (2015). 9000:2015 Quality management systems -- Fundamentals and vocabulary/ Sistemas de gestión de la calidad-- Fundamentos y vocabulario.
- [3] VIM. (2012). International vocabulary of metrology -- Basic and general concepts and associated terms. 3rd Edition.
- [4] ISO/IEC. (2020). 17000:2020 Conformity assessment -- Vocabulary and general principles.
- [5] ISO/TR. (2021). 10013:2021 Guidelines for quality management system documentation.
- [6] NMX-CH-152-IMNC. (2005). Metrología en química-vocabulario.
- [7] Morillas, P.P. y colaboradores. Eurolab España. (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. Recuperado de www.eurachem.org.
- [8] Miller, N.J., & Miller, J.C. (2002). Estadística y quimiometría para química analítica (4ª ed.). ISBN: 84-205-3514-1.
- [9] EN-ISO. (2021). 16140-3:2021 Microbiología de la cadena alimentaria - Validación de métodos - Parte 3: Protocolo para la verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados en un solo laboratorio.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

4. DESARROLLO

4.1. SELECCIÓN, MONTAJE Y ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO

4.1.1. Selección de métodos de ensayo

AOXLAB S. A. S. usa métodos y procedimientos apropiados para todas las actividades de laboratorio y para la evaluación de la incertidumbre de medición.


El laboratorio selecciona los ensayos que implementa, a partir de los requerimientos de los clientes, los objetivos de la organización y la visión de ésta, establecida por la alta dirección.

Es común que para la determinación de cierto analito en un tipo específico de matriz haya varios métodos analíticos disponibles, de orígenes muy variados. Existen muchas entidades nacionales e internacionales que publican métodos para los diferentes campos analíticos (físicos, químicos y biológicos) y sus aplicaciones. El laboratorio evalúa los diferentes métodos disponibles y selecciona aquel que mejor se adecue a las necesidades y los recursos del laboratorio, sus clientes y partes interesadas.

En cuanto a su origen, AOXLAB S. A. S. selecciona preferentemente métodos analíticos normalizados y publicados por entidades reconocidas tales como ISO, AOAC, USP, ICOTEC, etc. En caso de que resulte apropiado, También selecciona métodos comerciales proporcionados por laboratorios reconocidos como MEGAZYME, R-Biopharm y otros, que respalden la calidad de los resultados mediante certificaciones expedidas por organizaciones reconocidas.

Respecto de la aptitud para su uso, el laboratorio tiene precaución de seleccionar los métodos de ensayo, teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- El método de ensayo debe ser capaz de identificar y/o cuantificar el analito (mensurando) para el cual pretende utilizarse. Esto involucra aspectos tales como formas alotrópicas, isómeros, la especie química y sus interacciones con la matriz, las cuales pueden influir en el valor aparente de la especie medida. Un caso típico de esto es la determinación de especies químicas definidas operacionalmente como por ejemplo "metales extraíbles". Para el caso de los ensayos microbiológicos, deben contemplarse aspectos tales como orden, género, especie, etc.
- Debe ser aplicable a las matrices en las cuales el laboratorio prevé ensayar, las cuales se encuentran relacionadas en el alcance declarado en los métodos de ensayo normalizados. En el caso en el cual no sea posible disponer de un método de ensayo, deberá seleccionarse alguno cuya aplicabilidad sea razonablemente consistente con la matriz que el laboratorio pretende ensayar y realizar las modificaciones que se requieran al método original, (en caso de requerirse), para posteriormente evaluar su desempeño, mediante un ejercicio de validación

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02


- Debe ser capaz de cuantificar y/o identificar el analito en los intervalos y niveles de concentración en los cuales el laboratorio espera que este se encuentre en las matrices que pretende ensayar. Al igual que en el párrafo anterior, En el caso en el cual no sea posible disponer de un método de ensayo con un intervalo de aplicación que contenga el intervalo de aplicación que requiere el laboratorio, deberá seleccionar alguno cuya aplicabilidad sea razonablemente consistente con el rango de concentraciones que el laboratorio pretende ensayar y realizar las modificaciones que se requieran al método original, (en caso de requerirse), para posteriormente evaluar su desempeño, mediante un ejercicio de validación .
- En cuanto a los aspectos logísticos, el laboratorio debe optar por la selección de métodos de bajo costo, rápidos, de fácil implementación y que requieran personal con niveles de competencia bajos, que no requieran la adquisición o uso de equipos sofisticados, teniendo en cuenta que no se debe sacrificar la validez y aptitud para el uso previsto de los resultados que se pretende emitir.

En todo caso, debe preverse que el método de ensayo seleccionado puede alcanzar la precisión, exactitud e incertidumbre requerida por el laboratorio, el cliente, la legislación nacional y/o internacional, así como la normatividad reglamentaria del sector.

Otro aspecto relevante en el momento de seleccionar un método de ensayo es el uso previsto que se le va a dar al resultado, lo cual implica tener en cuenta lo siguiente:

- ¿La normatividad reglamentaria, la legislación nacional (o internacional) establecen que debe utilizarse un método de ensayo específico?
- ¿El resultado emitido se empleará para declarar la conformidad con respecto a alguna especificación?
- ¿El propósito del resultado es únicamente la verificación de actividades internas de control de calidad, que no inciden directamente, o no son críticas en relación con el cumplimiento de especificaciones reglamentarias o legales?
- ¿Debe expresarse de una manera específica el resultado y/o su incertidumbre?

En el marco del alcance flexible, cualquier modificación, adición de métodos o inclusión de nuevas matrices y analitos debe ser sometida a un riguroso proceso de verificación y validación, conforme a lo establecido en este procedimiento. Este proceso de validación debe garantizar que las modificaciones cumplan con los criterios de competencia, precisión y exactitud requeridos, manteniendo la integridad del sistema de gestión de calidad del laboratorio. Cada validación debe ser documentada y revisada para asegurar su conformidad con los límites de flexibilidad aprobados por ONAC.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

4.1.2. Montaje y estandarización de métodos analíticos

El montaje y estandarización del método de ensayo consiste en la implementación del ensayo de manera práctica en el laboratorio. En esta etapa, el personal a cargo ejecuta el análisis, empleando muestras retenidas o materiales de referencia y siguiendo las directrices establecidas en el método de referencia. Al mismo tiempo, se definen aquellos aspectos prácticos que no se encuentren claramente documentados en la bibliografía o que deban ajustarse a las condiciones del laboratorio. Por ejemplo, un método de referencia puede definir que en un determinado momento debe llevarse a cabo una agitación, pero no define el mecanismo su intensidad o duración. Es en esta etapa, donde el analista, mediante experimentación establece los parámetros apropiados para llevar a cabo esta operación, comparando los resultados de precisión y/o exactitud obtenidos de la ejecución del ensayo sobre estos, probando las diferentes opciones aplicables al proceso de agitación, con los valores asignados o resultados históricos de las muestras empleadas en los experimentos. Esta etapa de la implementación puede llevarse a cabo realizando ensayos de robustez, como se explica más adelante en el numeral 4.3.6.

Los resultados del proceso de montaje y estandarización del método deben utilizarse para documentar de manera detallada y sin ambigüedades el procedimiento interno para la ejecución del ensayo, el formato para la captura de datos primarios y el cuadro de mando para el control de calidad analítica, los cuales se implementan siguiendo los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-GC-003,


En el caso en el cual el laboratorio deba desarrollar métodos de ensayo, se realiza una planificación para esta actividad, la cual se registra en el formato FOR-TC- 019 Formato para desarrollo de nuevos métodos del Laboratorio. El plan para la implementación del nuevo método de ensayo se realiza siguiendo los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-GC-021 Procedimiento de gestión del cambio

4.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE VALIDACIÓN / VERIFICACIÓN

Validar un método es básicamente el proceso para definir un requisito analítico, y la verificación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas lo cual trae como necesidad inherente la evaluación del desempeño analítico del mismo.

Un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. Por ejemplo:

- Métodos no normalizados;
- Métodos diseñados/desarrollados por el laboratorio;
- Métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación;
- Ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para cumplir con los requisitos en relación con el uso que se le va a dar al método. La extensión ('alcance') de la validación dependerá de la aplicación, la naturaleza de los cambios realizados y de las circunstancias en que el método se va a utilizar.

El VIM [3] 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".

Para los métodos normalizados, tales como los publicados por, ejemplo, ISO, AOAC o ASTM, no es necesario validar el método utilizado. En estos casos, el trabajo de validación básica se ha realizado, pero el laboratorio debe verificar su capacidad para aplicar el método. Esto se realiza comparando los resultados obtenidos del ejercicio de verificación de uno o varios de los atributos del método de ensayo (los cuales se detallan en los numerales 4.3 o 4.4), con la información documentada en el método de referencia respecto del desempeño en dicho atributo.

También es necesaria la verificación cuando hay cambios importantes, como el uso de un equipo nuevo (pero similar), traslado de equipos, cambios en los requisitos analíticos, Recurrencia de trabajos no conformes o evidencia de que el proceso analítico está fuera de control estadístico, etc.


AOXLAB S. A. S., valida / verifica los métodos analíticos implementados, con el fin de establecer que cumplen con los requisitos de los clientes, los normativos y los propios del laboratorio y así asegurar que ellos son aptos para el uso previsto.

El desempeño de un método de ensayo se evalúa a través de la medición del comportamiento de las características o atributos que son propios de estos. En función del momento en que se efectúa en relación con la vida útil del ensayo, la validación o verificación puede ser prospectiva o retrospectiva.

La validación o verificación prospectiva se efectúa ejecutando un diseño experimental previamente elaborado, con el propósito de recopilar datos a partir de ensayos que se ejecutarán en el futuro y así poder evaluar los atributos del ensayo. Por lo general, este tipo de ejercicio se desarrolla durante la implementación del método analítico en el laboratorio.

La validación o verificación retrospectiva se efectúa cuando el método analítico ya ha sido implementado y se encuentra en producción. Este enfoque supone la recolección de datos históricos de control de calidad que permiten evaluar las diferentes características de desempeño de dicho ensayo.

De acuerdo con el tipo de ensayo, el uso previsto de los resultados obtenidos empleando el método analítico y el alcance del ejercicio de validación o verificación, pueden evaluarse algunos o todos los atributos que se describen en los numerales siguientes.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

4.3. Atributos o características a evaluar en los métodos analíticos fisicoquímicos.

A continuación, se detallan los diferentes atributos a evaluar en los métodos de ensayos fisicoquímicos y la manera en la cual se realizan los diferentes cálculos para su evaluación. Alternativamente, puede emplearse la herramienta de validación de métodos fisicoquímicos SOFT-TC-079

4.3.1. Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación que se evalúan en AOXLAB S. A. S., son los correspondientes al del método analítico aplicado en su totalidad. Esto quiere decir que para ello se utilizan ítems de ensayo que han sido sometidos a todos los pasos contemplados durante el ensayo, incluidos procesos de toma de alícuotas, extracción, digestión y cualquiera otra contemplada en la descripción del procedimiento analítico.

Las muestras usadas para la evaluación de los límites de detección y cuantificación pueden ser:

- Blancos de matriz
- Muestras de ensayo con concentraciones de analito cercanas o por debajo del límite de cuantificación esperado.


El uso de blancos de matriz resulta apropiado cuando se evalúan métodos en los cuales se obtiene una señal medible para un blanco, como por ejemplo en métodos espectrofotométricos.

Para el caso de metodologías analíticas en las cuales no es posible obtener valores de señal diferentes de cero, o que se basan en detectar un pico por encima del ruido, como por ejemplo los métodos cromatográficos, se requieren muestras de matrices con niveles de concentración cercanas o por encima del límite de detección. En el caso de que no sea posible o apropiado contar con muestras que cumplan esta característica, éstas pueden ser preparadas mediante la fortificación de un blanco de matriz.

Cuando el ejercicio de validación o verificación cubra dentro de su alcance matrices diversas, es necesario determinar los límites de detección y cuantificación para cada matriz por separado.

Para obtener una estimación confiable, de dichos límites, debe realizarse a partir de resultados provenientes de la ejecución de ensayos sobre alguno de los tipos de muestra descritos anteriormente, obtenidos en condiciones de precisión intermedia. El número de réplicas debe ser suficiente para obtener un estimado adecuado de la desviación estándar. El número de resultado adecuado para realizar una estimación aceptable del límite de cuantificación debe estar entre 6 y 15.

Los límites de detección y cuantificación se estiman llevando a cabo los siguientes pasos:

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

4.3.1.1. Estimación de la desviación estándar de las medidas realizadas:

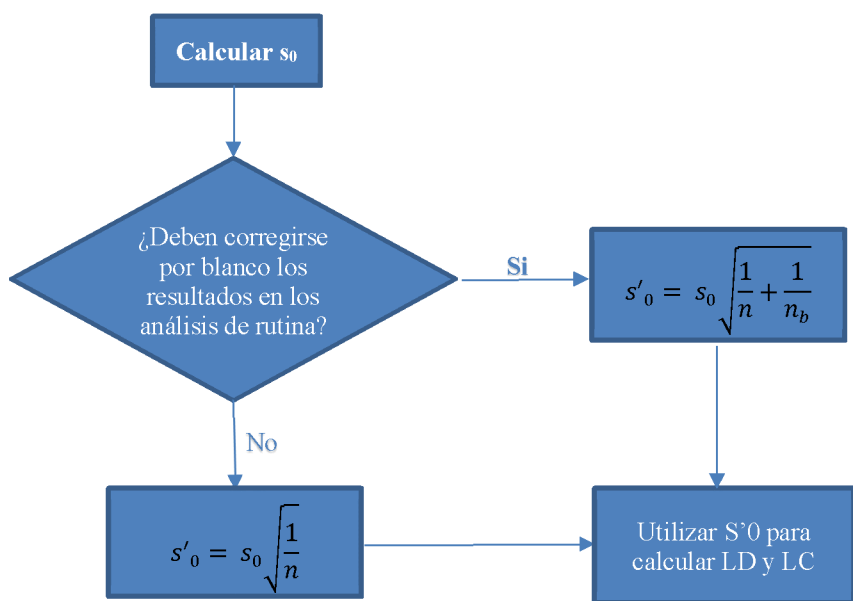
Aplicando la siguiente ecuación:

$$s_0 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde n corresponde al número de resultados obtenidos del análisis de las correspondientes réplicas y x corresponde a cada resultado obtenido.

4.3.1.2. Cálculo de la desviación estándar ajustada:

Una vez calculada la desviación estándar (s_0), esta debe corregirse, en caso de que el método analítico establezca correcciones por blanco, o si el procedimiento de rutina define el resultado final como el promedio de dos o más resultados obtenidos sobre la misma muestra. Para llevar a cabo este ajuste, debe seguirse el diagrama de flujo siguiente:




Donde s'_0 corresponde a la desviación estándar ajustada, n representa el número de datos por cada muestra a partir del cual se reporta el resultado del ensayo como un promedio y n_b corresponde al número de blancos analizados para realizar la corrección por blanco del resultado a reportar.

Cálculo de los límites de detección y cuantificación estimados

El límite de detección estimado se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$LD = 3 \times s'_0$$

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

El límite de cuantificación se estima como:

$$LC = 10 \times s'_0$$

4.3.2. Intervalo de trabajo

Este parámetro debe documentarse como parte del alcance del ejercicio de validación o verificación del método analítico y debe considerar tanto la linealidad del método analítico como la de la calibración del instrumento en los casos que aplique.

4.3.2.1. Intervalo de trabajo del instrumento.

Se debe realizar en los métodos de ensayo cuyo fundamento se basa en técnicas instrumentales, con el fin de establecer:

- El tipo de relación existente entre la respuesta instrumental y la concentración del analito. (lineal, cuadrática, exponencial, etc.)
- Demostrar que el intervalo de trabajo es compatible con lo establecido en la bibliografía de referencia y con las especificaciones analíticas definidas en el plan de validación.
- Verificar que el método de calibración propuesto en el procedimiento analítico es apropiado.


Para evaluar el intervalo de trabajo instrumental, deben usarse patrones de calibración cuyas concentraciones del analito estén uniformemente espaciadas en el intervalo de trabajo. Si el método de referencia no especifica un número determinado de patrones a utilizar, deben seleccionarse entonces entre 6 y 10 niveles de concentración para realizar dicha evaluación. Cada patrón debe leerse por lo menos dos veces en el instrumento.

Una vez obtenidas las respuestas instrumentales para cada nivel de concentración, se procede a elaborar un diagrama de dispersión, donde en el eje *x* se grafica la concentración y en el eje *y* la respuesta instrumental. La evaluación inicial del intervalo de trabajo se realiza mediante una inspección visual de dicho diagrama (curva de calibración). El siguiente paso es verificar la relación entre la concentración y la respuesta del instrumento revisando las estadísticas de regresión y el gráfico de residuales del modelo elegido (por ejemplo, lineal, cuadrático)

Para obtener las estadísticas de regresión se utiliza una hoja de cálculo de MS Excel de la siguiente manera:

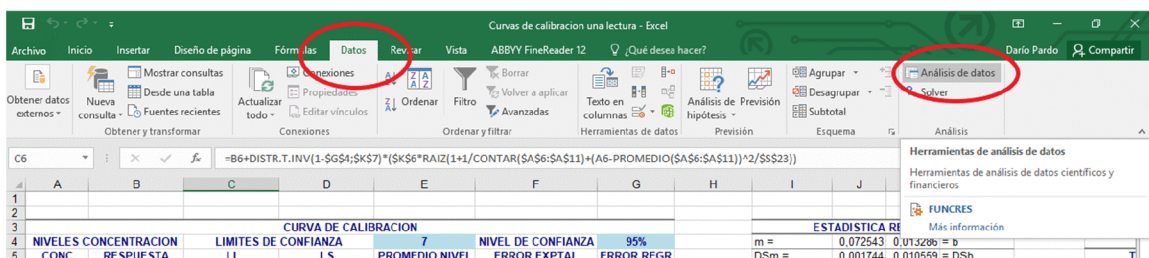
Los datos obtenidos deben organizarse en dos columnas. La primera debe contener la concentración de los patrones de calibración y la segunda la respuesta instrumental obtenida para cada uno de ellos. A continuación, se muestra un ejemplo:

NIVELES CONCENTRACION

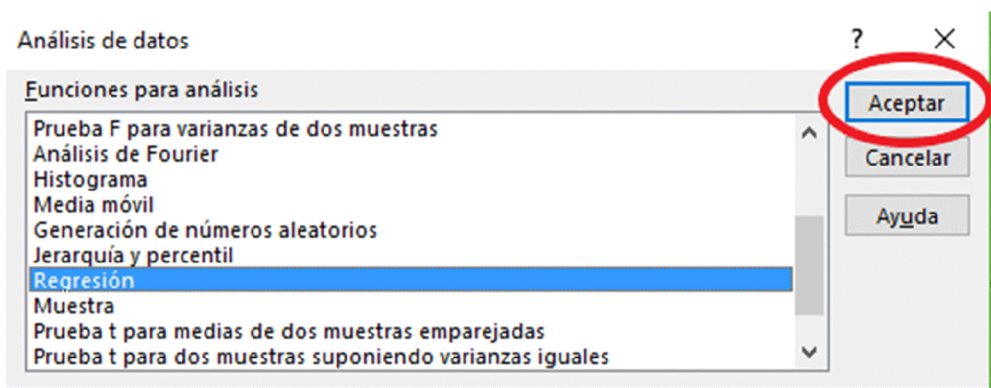
	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

CONC mg/l	RESPUESTA
0,00	0,009
2,00	0,158
4,00	0,301
6,00	0,472
8,00	0,577
10,00	0,739

Una vez que se tiene la matriz de datos, se selecciona la pestaña “Datos” del menú principal y se selecciona la opción “Análisis de Datos” como se muestra en la figura siguiente:




En el menú que aparece a continuación, seleccionar la opción “regresión” y pulsar el botón “Aceptar”.

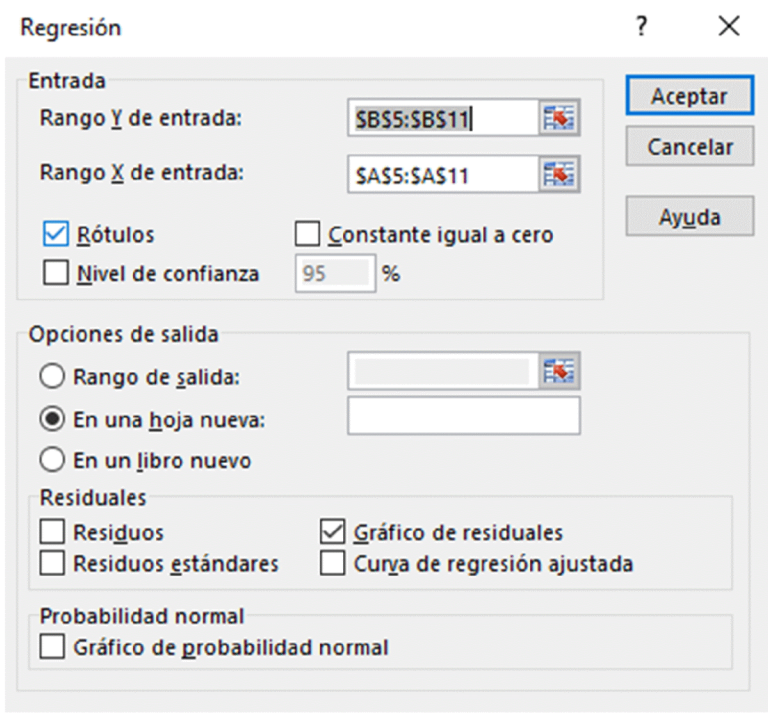


En seguida, aparecerá el cuadro de dialogo “Regresión”, en el cual deben ingresarse las diferentes opciones de la siguiente manera:

- Ubicar el cursor en la opción “Rango Y de entrada”, y seleccionar el rango que contiene las respuestas instrumentales, incluido el título de la columna.
- Ubicar el cursor en la opción “Rango X de entrada”, y seleccionar el rango que contiene las concentraciones de los patrones de calibración, incluido el título de la columna.
- Seleccionar la casilla “Títulos”
- En el menú “Opciones de salida”, seleccionar “En una hoja nueva”

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

- Seleccionar la casilla “Gráfico de residuales”.
- El gráfico siguiente proporciona un ejemplo del diligenciamiento del cuadro de dialogo.



Regresión

Entrada

Rango Y de entrada: \$B\$5:\$B\$11

Rango X de entrada: \$A\$5:\$A\$11

Rótulos Constante igual a cero

Nivel de confianza 95 %

Opciones de salida

Rango de salida:

En una hoja nueva:

En un libro nuevo

Residuales

Residuos Gráfico de residuales

Residuos estándares Curva de regresión ajustada

Probabilidad normal

Gráfico de probabilidad normal

Aceptar

Cancelar

Ayuda


- Pulsar el botón “Aceptar”.

La estadística de regresión será proporcionada en una nueva hoja de cálculo y sus resultados se explican a continuación:

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99884641
Coeficiente de determinación R ²	0,99769416
R ² ajustado	0,9971177
Error típico	0,01458913
Observaciones	6

El término coeficiente de correlación múltiple se refiere al coeficiente de los dos conjuntos de datos, el cual debe compararse contra el criterio de aceptación definido por el laboratorio.

El término error típico es también denominado desviación estándar residual.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	0,368372629	0,368372629	1730,725821	1,99537E-06	
Residuos	4	0,000851371	0,000212843			
Total	5	0,369224				

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,013285714	0,010558841	1,258255024	0,276737303	-0,016030327	0,04260176
CONC	0,072542857	0,001743735	41,60199299	1,99537E-06	0,067701472	0,07738424

La explicación de los fundamentos estadísticos del análisis de regresión está más allá del objetivo de este procedimiento. Por tal motivo únicamente se establecerán directrices respecto de la evaluación de los resultados importantes arrojados por Ms Excel.

El valor de *F* debe ser mayor al *valor crítico de F*. esto indica que la relación entre concentración y respuesta instrumental no está explicada por el azar.

En la segunda tabla, la fila "*Intercepción*", contiene los datos correspondientes al intercepto de la ecuación de regresión.

La fila "*Conc*", contiene los datos respectivos a la pendiente. (La fila tiene la denominación Conc, porque en el ejemplo aplicado así se denominó al rango que contiene los valores correspondientes a las concentraciones de los patrones de calibración. Por tanto, este término puede variar).

En esta misma tabla, la columna "*Coefficientes*" contiene los valores de la pendiente y el intercepto.

La columna "*Error típico*", contiene la desviación estándar de la pendiente y el intercepto.


La columna "*Estadístico t*", contiene el valor calculado de *t de Student* para la comparación de los coeficientes obtenidos con el valor de cero.

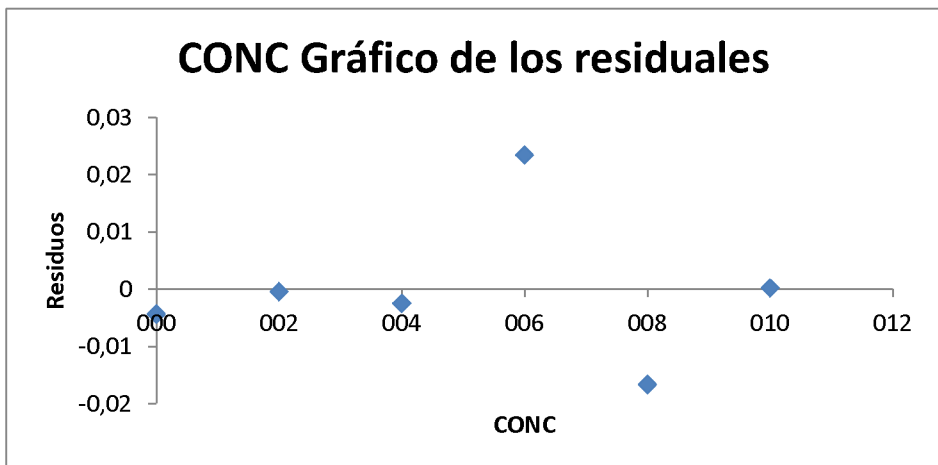
La columna "*Probabilidad*" muestra la probabilidad de que cada uno de los coeficientes sea estadísticamente igual a cero.

Las columnas "*Inferior 95%*" y "*Superior 95%*" constituyen el intervalo de confianza para cada uno de los coeficientes.

Como criterio para la evaluación de la pendiente debe tenerse en cuenta, que el valor de la columna "*Probabilidad*", debe ser menor que 0.05. esto indica que el valor de la pendiente del ajuste es estadísticamente diferente de cero, es decir que la pendiente es significativa.

En cuanto al intercepto, debe ocurrir exactamente lo contrario. El valor de la columna "*Probabilidad*" debe ser mayor a 0.05, lo que indica que el intercepto es estadísticamente cero. Por lo general esto es una característica deseable en las funciones de calibración con respuestas instrumentales directamente proporcionales a la concentración.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02



El gráfico de residuales consiste en una representación bidimensional de los valores de los residuos. El residuo es la diferencia entre la respuesta instrumental obtenida para un patrón de calibración y la pronosticada por el modelo de ajuste lineal.

Esta gráfica debe inspeccionarse visualmente y los puntos correspondientes a los residuos deben distribuirse en forma aleatoria. No deben evidenciarse tendencias tales como distribución en forma de "u", en forma de "n", en forma de ">" o de "<".

4.3.2.2. Intervalo de trabajo del método de ensayo.

Para evaluar el intervalo de trabajo del método analítico, debe contarse con muestras de concentración conocida, materiales de referencia certificados y/o blancos de laboratorios fortificados. Los valores de concentración de los ítems de ensayo seleccionados deben cubrir el intervalo de trabajo del método analítico propuesto en el plan de validación o verificación. Sobre estos ítems, debe aplicarse todo el método de ensayo, incluyendo las etapas preparativas, tales como digestión, extracción, etc., así como la calibración del instrumento (si aplica).


Se debe establecer el intervalo de trabajo del método para cada matriz propuesta en el alcance del método analítico.

Para evaluar el intervalo de trabajo del método analítico, se procede de igual manera que en el numeral anterior, cambiando los siguientes pasos:

La gráfica se elabora graficando en el eje y las concentraciones experimentales obtenidas aplicando el método analítico en su totalidad sobre los ítems de ensayo.

La evaluación de la pendiente se realiza verificando que el intervalo de confianza, es decir el rango comprendido entre los valores correspondientes a las columnas "Inferior 95%" y "Superior 95%" contengan el valor 1.

Si el método analítico es exacto en el intervalo de trabajo propuesto, la gráfica de concentración teórica (o certificada) de los ítems de ensayo vs la concentración

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

experimental obtenida, debe corresponder a una línea con un valor de intercepto igual a cero y un valor de la pendiente igual a 1.

4.3.3. Precisión

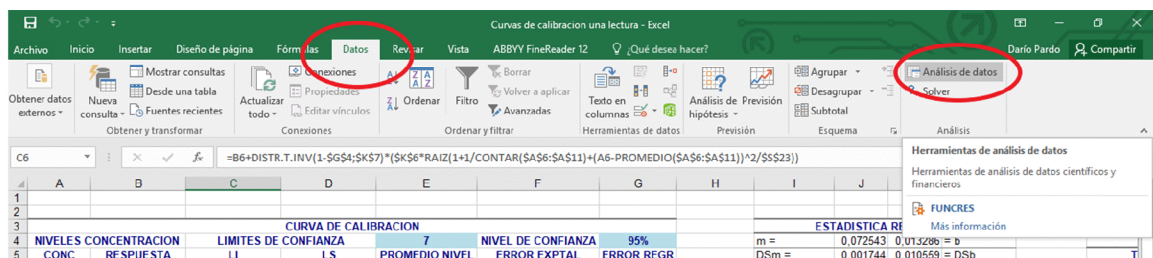
La evaluación de la precisión requiere la realización de mediciones repetidas en materiales representativos de las matrices sobre las cuales se va a aplicar el método y la concentración de analito, la homogeneidad y la estabilidad. Para evaluar este atributo no se requieren materiales de referencia certificados. Las réplicas de los ensayos también deben ser independientes, esto es, todo el proceso de medición, incluyendo los pasos de preparación de muestras, debe repetirse. El número mínimo especificado de repeticiones debe ser de 6 a 15.

Las porciones de ensayo de las matrices especificadas en el alcance de la validación o verificación se analizan por replicado en condiciones de repetibilidad a través de un número de diferentes series de medida, con una variación máxima en condiciones entre las series de medida (diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.). Mediante ANOVA de un factor, la repetibilidad puede calcularse como la precisión dentro del grupo, mientras que la precisión intermedia se obtiene como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de la precisión dentro del grupo y entre grupos.


Para calcular el coeficiente de variación de la repetibilidad y la reproducibilidad mediante ANOVA, utilizando la herramienta "Análisis de datos" de MS Excel, deben arreglarse los datos en una tabla como la que se muestra a continuación:

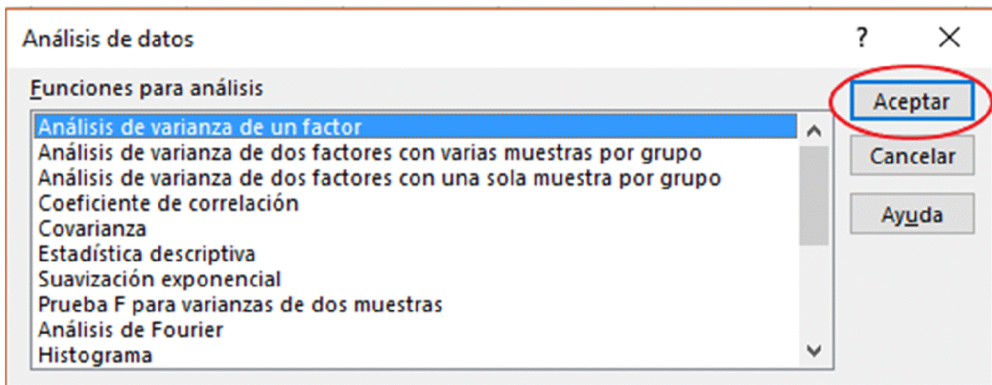
Resultado (mg/l)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6
Réplica 1	2,05	2,06	2,07	2,07	2,07	2,07
Réplica 2	2,04	2,05	2,05	2,05	2,06	2,06

Una vez que se tiene la matriz de datos, se selecciona la pestaña "Datos" del menú principal y se selecciona la opción "Análisis de Datos" como se muestra en la figura siguiente:



En el menú que aparece a continuación, seleccionar la opción "Análisis de varianza de un factor" y pulsar el botón "Aceptar".

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02



En seguida, aparecerá el cuadro de dialogo “*Análisis de varianza de un factor*”, en el cual deben ingresarse las diferentes opciones de la siguiente manera:

Ubicar el cursor en la opción “*Rango de entrada*”, y seleccionar el rango que contiene los resultados, incluido el título de la columna.

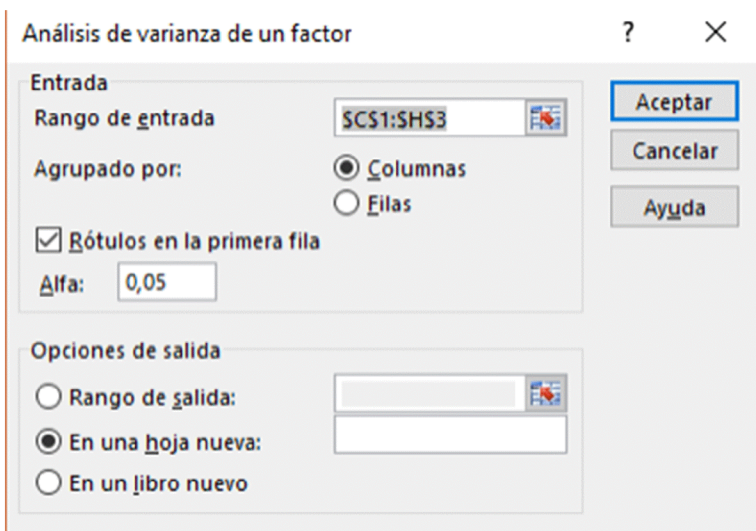
Seleccionar la opción “*Columnas*” en la sección “*Agrupar por:*”

Seleccionar la casilla “*Rótulos en la primera fila*”


Introducir el valor 0.05 en el cuadro de texto “*Alfa*”.

En el menú “*Opciones de salida*”, seleccionar “*En una hoja nueva*”

El gráfico siguiente proporciona un ejemplo del diligenciamiento del cuadro de dialogo.



Los resultados de los cálculos ANOVA serán proporcionados en una nueva hoja de cálculo y sus resultados se explican a continuación:

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Lote 1	2	4,08877551	2,044387755	6,2995E-05		
Lote 2	2	4,109183673	2,054591837	4,217E-05		
Lote 3	2	4,123469388	2,061734694	0,00011714		
Lote 4	2	4,121428571	2,060714286	0,00015046		
Lote 5	2	4,123469388	2,061734694	4,217E-05		
Lote 6	2	4,136734694	2,068367347	3,3319E-05		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,000675153	5	0,000135031	1,80743322	0,245646463	4,387374187
Dentro de los grupos	0,000448251	6	7,47085E-05			
Total	0,001123403	11				

Antes de proseguir, debe verificarse que el valor tabulado en la columna "F" sea inferior al valor tabulado en la columna "Valor crítico para F". de ser así, esto indicaría que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos al modificar el factor de variación. (en este caso lotes de análisis). De lo contrario, implicaría que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes lotes de análisis, lo cual implica que el desempeño del método no fue uniforme en el tiempo.

4.3.3.1. Estimación del coeficiente de variación de la repetibilidad

Para estimar el coeficiente de variación de la repetibilidad ($D. S._r$) se parte de los siguientes resultados ANOVA:

La varianza de la repetibilidad corresponde con el valor de la columna "Promedio de cuadrados" para la fila "Dentro de grupos". Por tanto, la desviación estándar de la repetibilidad será la raíz cuadrada de este valor.

El promedio se calcula como el promedio de los valores encontrados en la columna "Promedio" de la primera tabla.

El coeficiente de variación de la repetibilidad se calcula como:

$$C. V._r \% = \frac{D. S._r}{\bar{x}} \times 100$$


4.3.3.2. Estimación del coeficiente de variación de la reproducibilidad

Este cálculo se realiza de la siguiente manera:

La varianza neta entre grupos se calcula como:

$$S_L = \frac{S_E - S_D}{n}$$

Donde S_E corresponde a la varianza entre grupos y S_D corresponde a la varianza dentro de grupos arrojada por los cálculos ANOVA. n corresponde al número de réplicas por grupo.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

La varianza de la reproducibilidad S_R , se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$S_R = S_r + S_L$$

Por tanto, la desviación estándar de la reproducibilidad se calcula como la raíz cuadrada de S_R .

El promedio se calcula como el promedio de los valores encontrados en la columna "*Promedio*" de la primera tabla.

Finalmente, el coeficiente de variación de la reproducibilidad se obtiene de aplicar la siguiente ecuación:

$$C.V._R \% = \frac{D.S._R}{\bar{x}} \times 100$$

Los estimadores de la repetibilidad y la reproducibilidad (S , $D.S.$, $C.V.$ %) deben compararse con los criterios de aceptabilidad previamente establecidos por el laboratorio en el plan de validación.

La precisión varía de acuerdo con la concentración de analito. Por esto, debe evaluarse a concentraciones cercanas a los valores que demarcan el intervalo de trabajo del método analítico y preferiblemente a valores cercanos a un valor máximo o mínimo de interés si es necesario.

4.3.4. Veracidad


Como se expresó en la sección 2.1, el término Veracidad se define como la proximidad de la media de un número infinito de resultados (producidos con el método) a un valor de referencia. Puesto que no se puede realizar un número infinito de mediciones, resulta impracticable medir la veracidad. Sin embargo, es posible realizar una evaluación experimental de la veracidad. Por lo general, esta evaluación se expresa cuantitativamente en términos de '*sesgo*'.

La determinación práctica del sesgo se basa en la comparación de la media de los resultados del método sometido al proceso de validación o verificación con un valor de referencia adecuado. Para ello, pueden utilizarse tres enfoques:

4.3.4.1. Análisis de materiales de referencia

Para determinar el sesgo utilizando un material de referencia certificado (MRC), se determinan la media y la desviación estándar de una serie de mediciones repetidas y se comparan los resultados con el valor asignado para la propiedad del MRC. El MRC adecuado es un material de referencia de matriz certificado con valores de las propiedades próximos a los de las muestras de ensayo de interés.

Es importante que el material seleccionado está acorde con el alcance del método sometido a evaluación. En algunos casos podría ser necesario considerar cómo fue

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

caracterizado el MRC, por ejemplo, debe tenerse en cuenta, si el procedimiento de preparación de muestras utilizado durante la caracterización del material tiene como propósito establecer la cantidad extraída del analito en ciertas condiciones y no la concentración total del mismo. Así mismo, los analitos pueden estar presentes en diferentes formas. Es importante entonces, que el MRC contenga las formas en las cuales se presenta el analito, de acuerdo con la naturaleza del método y el alcance de la evaluación.

El sesgo debe evaluarse en cada matriz objeto del alcance de la evaluación del método. El número de datos con los cuales debe contarse para la evaluación del sesgo debe estar entre 6 y 15 por cada ítem de ensayo, preferiblemente obtenidos en condiciones de precisión intermedia. Resulta también importante evaluar el sesgo en el rango de trabajo, seleccionando MRC apropiados o preparando matrices adicionadas, principalmente cerca de valores máximos o mínimos de interés.

4.3.4.2. Experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas

Resulta también aplicable, llevar a cabo estudios de recuperación (experimentos con adiciones) para dar una indicación del nivel de sesgo probable del método analítico.

Con el fin de evaluar la eficiencia de algunas etapas preparativas de los métodos de ensayo, como, por ejemplo, extracción, digestión, etc. El ejercicio consiste en adicionar porciones de ensayo con el analito en diferentes concentraciones, luego aplicar el método analítico a las porciones de ensayo adicionadas y medir la concentración del analito. Debe tenerse en cuenta que el analito introducido de esta manera probablemente no estará tan fuertemente ligado como el que está naturalmente presente en la matriz y, por lo tanto, podría obtenerse un resultado de recuperación alto, que no refleje la eficiencia real del método.


4.3.4.3. Comparación con resultados obtenidos mediante otro método

Puede ser posible evaluar el sesgo comparando los resultados del método candidato con los obtenidos de un método de referencia, el cual debe ser un método normalizado o adoptado por consenso.

La ventaja de este enfoque es que los materiales no tienen que ser MRC, sino que se evalúa el método en muestras reales que representan el quehacer cotidiano del laboratorio. El valor aceptado como verdadero, es obtenido de los resultados arrojados por el método de referencia.

4.3.4.4. Expresión del sesgo

El sesgo (*b*) de un método analítico puede expresarse de las siguientes maneras:

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Cuando se comparan los resultados obtenidos contra un valor de referencia, puede expresarse en forma absoluta

$$b = \bar{x} - x_{ref}$$

Donde \bar{x} corresponde a la media de los resultados obtenidos de la aplicación del método analítico sobre un material de referencia y x_{ref} es el valor certificado o el valor aceptado como verdadero para dicho material, establecido mediante un certificado o la aplicación de un método de referencia.

Es posible también expresar el sesgo en forma relativa

$$b = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}}$$

O como sesgo relativo porcentual

$$b\% = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$$

También es posible medir el sesgo como porcentaje de recuperación

$$R\% = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100$$


Cuando al diseño experimental involucra la preparación de adicionados, deben analizarse las muestras de las diferentes matrices adicionadas simultáneamente con matrices sin adicionar. La recuperación se calcula entonces como

$$R\% = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{Adc}} \times 100$$

Donde \bar{x}' es el valor promedio de las adiciones obtenido experimentalmente, \bar{x} el valor medio de la concentración media del analito presente en las muestras sin adicionar y x_{Adc} corresponde al valor teórico de la adición realizada sobre cada matriz.

4.3.4.5. Evaluación del sesgo

Con el fin de evaluar la relevancia del sesgo, se realiza un contraste estadístico *t de Student*, y se le compara con un valor crítico de *t* con *n-1* grados de libertad y un nivel de confianza (1- α) establecido previamente. Si el valor de *t* calculado es menor que el correspondiente valor crítico, se acepta la hipótesis nula que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el valor experimentalmente obtenido y el valor aceptado como referencia. En caso contrario, debe aceptarse la hipótesis alternativa: es decir que existen diferencias significativas estadísticamente y por tanto debe incorporarse un factor de corrección en el cálculo de los resultados obtenidos mediante la aplicación del método analítico.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Las ecuaciones por utilizar para realizar el contraste de significación son:

$$t = \frac{|x_{ref} - \bar{x}|}{s/\sqrt{n}}$$

Donde \bar{x} corresponde a la media de los resultados obtenidos de la aplicación del método analítico sobre un material de referencia, x_{ref} es el valor certificado o el valor aceptado como verdadero para dicho material, s es la desviación estándar de los valores experimentales y n corresponde al número de estos.

Esta ecuación se utiliza cuando la incertidumbre sobre el valor de referencia es nula (un valor teórico) o despreciable.

Cuando se es posible conocer la incertidumbre estándar del valor de referencia y los grados de libertad con los cuales esta fue estimada, o el valor de referencia fue obtenido mediante una serie de mediciones repetidas realizadas en el laboratorio, el estadístico t se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$t = \frac{|x_{ref} - \bar{x}|}{\sqrt{\frac{s^2}{n} + \frac{s_{ref}^2}{n_{ref}}}}$$

Donde s_{ref} corresponde a la incertidumbre estándar o desviación estándar asociada al valor de referencia y n_{ref} corresponde a los grados de libertad con los cuales se estimó s_{ref} . Las otras variables fueron explicadas en párrafos anteriores.


Los grados de libertad con los cuales se realiza el cálculo del estadístico t utilizando la ecuación anterior, vienen dados por:

$$g. l. = \frac{\left(\frac{s^2}{n} + \frac{s_{ref}^2}{n_{ref}}\right)^2}{\left(\frac{s^4}{n^2(n-1)} + \frac{s_{ref}^4}{n_{ref}^2(n_{ref}-1)}\right)}$$

El resultado obtenido debe redondearse al valor entero más cercano.

4.3.5. Selectividad

Habitualmente los métodos analíticos consisten en una etapa de medición, la cual puede o no ser precedida por una etapa de aislamiento del analito. En la etapa de medición, normalmente se mide una magnitud física o una respuesta instrumental y no la concentración de analito directamente. De ahí, resulta vital asegurar que la propiedad medida sólo se debe al analito y no a otra sustancia o cuerpo, química o físicamente similar que cause interferencia.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Las interferencias pueden causar un sesgo al aumentar o disminuir la atenuar atribuida al mensurando.

La selectividad de un procedimiento debe ser evaluada para métodos no normalizados, métodos adaptados de la literatura científica y métodos normalizados que se utilizan fuera de su alcance original. Los métodos normalizados aplicados dentro de su alcance no requieren de la evaluación de la selectividad, ya que usualmente este atributo habrá sido estudiado como parte del proceso de normalización. En lugar de ello, resulta importante, documentar y aplicar los procedimientos para el manejo de interferencia establecidos en los métodos de regencia.

Generalmente, la selectividad de un método se investiga estudiando su habilidad de medir el analito de interés en muestras a la cuales se le agregaron intencionalmente interferencias específicas. En aquellos casos donde no esté claro si las interferencias ya están presentes o no, la selectividad del método puede ser evaluada estudiando su habilidad de medir el analito comparado con otros métodos independientes.

Un aspecto importante de la selectividad que debe ser considerado es el caso en el que un analito pueda existir en la muestra en más de una forma, En ese caso, la definición del mensurando es crítica para evitar confusión.

La evaluación de la selectividad puede realizarse a través de dos enfoques:

4.3.5.1. Comparación con un método confirmatorio

Esta opción implica el análisis de muestras y materiales de referencia aplicando el método analítico bajo evaluación y un método analítico de referencia o confirmatorio. En este caso, se utilizan los resultados obtenidos de las técnicas confirmatorias para evaluar la capacidad del método para verificar la identidad del analito y su capacidad para medir el analito aislado de otras interferencias.


4.3.5.2. Análisis de matrices con interferencias adicionadas

Este enfoque consiste en aplicar el método de ensayo sobre muestras de matrices a las cuales se les han adicionado sustancias de las cuales se sospecha que generan interferencias, preferiblemente a varios niveles de concentración tanto del analito como de las interferencias.

La investigación se lleva a cabo evaluando el sesgo introducido por los distintos interferentes en los resultados obtenidos.

4.3.6. Robustez

Existen ciertas etapas durante la realización de ensayos, que, si no se realizan con suficientemente cuidado, tendrán un efecto significativo en el desempeño del método

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Estas etapas deben ser identificadas, como parte del desarrollo del método, junto con la influencia en el desempeño del método evaluado. Un "ensayo de robustez" implica hacer cambios deliberados en el método, e investigar el efecto subsiguiente en el desempeño. La robustez de un procedimiento debe ser establecida para los métodos de desarrollo interno, métodos adaptados de la literatura científica y los métodos normalizados utilizados fuera del su alcance. Cuando se utilizan normalizados dentro del alcance de aplicación, la robustez por lo general ha sido previamente estudiada como parte del proceso de normalización.

La información sobre la robustez se debe indicar en el procedimiento del laboratorio en forma de los límites de tolerancia establecidos para los parámetros experimentales críticos.

El diseño experimental implementado en el laboratorio para la evaluación de la robustez es el conocido como *Youden - Steiner*. Este diseño permite evaluar hasta 7 factores de influencia con 8 ensayos.


Cada factor cuya influencia sobre el método analítico se desea evaluar es nombrado con una letra *A, B, C...G* y debe ensayarse en dos condiciones: la condición normal definida en el procedimiento, demarcada como "+" y la condición alterada del mismo identificada como "-".

El diseño experimental de *Youden - Steiner* sigue el esquema ilustrado en la tabla siguiente:

Condición	1	2	3	4	5	6	7	8
A	+	+	+	+	-	-	-	-
B	+	+	+	-	+	-	-	-
C	+	-	+	-	+	-	+	-
D	+	+	-	-	-	-	+	+
E	+	-	+	-	-	+	-	+
F	+	-	-	+	+	-	-	+
G	+	-	-	+	-	+	+	-
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Se obtienen así 8 resultados (denominados *s, t, u, v, w, x, y, z*) los cuales fueron obtenidos aplicando a cada ensayo las condiciones definidas en la tabla anterior.

El siguiente paso consiste en obtener las diferencias entre el promedio de los resultados obtenidos en cada ensayo, aplicando la condición normal y la alterada para cada factor evaluado. Tomando como ejemplo la condición A:

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

$$A = (\bar{A}^+ - \bar{A}^-) = \left(\frac{s + t + u + v}{4} \right) - \left(\frac{w + x + y + z}{4} \right)$$

De igual manera deben calcularse las diferencias para los demás factores (*B, C, D...G*)

Entre mayor cada diferencia, más significativo es el efecto del cambio sobre la condición. Se considera que el método analítico es sensible al cambio en dicha condición cuando la diferencia es mayor a $\sqrt{2} s$ donde *s* es la desviación estándar calculada para el método analítico.

Si por alguna circunstancia, AOXLAB S. A. S., evalúa únicamente un único factor de robustez, o una combinación de varios factores, simplemente se realizará un análisis ANOVA de un factor, siguiendo el procedimiento descrito en el numeral 4.3.3 y comprobando que el valor de *F* obtenido sea inferior al *valor F crítico*.

En el procedimiento interno deben entonces documentarse los factores a los cuales el método es sensible y las tolerancias para ellos.

4.3.7. Estimación de la incertidumbre

La estimación de la incertidumbre de los resultados de análisis fisicoquímicos se realiza de acuerdo con las directrices dadas en el procedimiento respectivo PROC – TC - 002.

4.4. Atributos o características a evaluar en los métodos analíticos microbiológicos cualitativos para la industria de alimentos

NOTA: Los cálculos para estimar los atributos de los métodos de ensayos microbiológicos descritos en este numeral, se realizan empleando la herramienta SOFT-TC-078 Herramienta validación ensayos microbiológicos para la industria de alimentos


4.4.1. Generalidades

En microbiología, La verificación de los métodos cualitativos (de detección) y los métodos cuantitativos se realiza en dos partes:

4.4.1.1. Verificación de la implementación

La verificación se centra en los ítems (alimentos) que están dentro del alcance de la validación y dentro del alcance de la aplicación de laboratorio.

Antes de realizar la verificación del método, el analista y la dirección técnica deben consultar los informes de validación publicados por los organismos de normalización reconocidos y / o los organismos de certificación de métodos, como fuentes para el

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

alcance de la validación y para seleccionar los ítems (alimentarios) apropiados para la verificación.

La verificación de la implementación ocurre antes de la verificación del ítem (alimento). Las reglas técnicas para realizar la verificación de la implementación y la verificación del ítem (alimentario) se dan el numeral 4.4 para los métodos cualitativos y en el numeral 4.5 para métodos cuantitativos.

La verificación de la implementación tiene como objetivo demostrar la competencia del laboratorio para ejecutar el método validado. Esto se logra demostrando su capacidad para obtener los resultados esperados en un ítem (alimento).

El laboratorio debe:

- Revisar los datos de validación del método.

Para métodos de ensayo cualitativos:

- Seleccionar un artículo (alimento) probado durante el estudio de validación que pertenezca al ámbito de aplicación del laboratorio del usuario.
- Cuando los artículos (alimentos) incluidos en el estudio de validación no pertenecen al alcance de aplicación de laboratorio, se deberá incluir uno de los ítems (alimentos); esto es necesario porque el límite de detección del método se ve afectado por el ítem (alimento).
- Utilizar el ítem (alimento) seleccionado y el tamaño de muestra que se utilizó en el estudio de validación para realizar la verificación de la implementación

Para métodos cuantitativos:


- Seleccionar cualquier artículo (alimento) que pertenezca al alcance de la validación del método (pero que no necesariamente se pruebe durante la validación).

4.4.1.2. Verificación en ítems (alimentos)

La verificación del artículo (alimento) tiene como objetivo demostrar la competencia del laboratorio para ejecutar el método validado con ítems (alimentos) que se ensayan rutinariamente.

El laboratorio debe:

- Seleccionar un ítem (alimento) de cada categoría enumerada dentro del alcance de la validación que coincida con una categoría de alimento dentro del alcance de la aplicación por el laboratorio.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

- Usar este ítem (alimento) y el tamaño de la muestra (o un tamaño de muestra más pequeño si se usa habitualmente) utilizado en el estudio de validación para realizar la verificación del ítem (alimento).

4.4.2. Requerimiento para la implementación de la validación.


Para realizar la verificación de métodos de ensayo cualitativos, debe seleccionarse mínimo una categoría de alimento incluida en la validación (para la verificación de la implementación), y al menos un ítem representativo de cada una de las categorías diferentes de alimentos no analizados durante la validación (para la verificación en ítems). Es decir, si el método de referencia declara que la categoría lácteos, el ensayo fue validado con un ítem queso, la verificación de la implementación realizada por el laboratorio debe incluir un ítem queso.

Para el caso de los métodos de ensayo cuantitativos, el laboratorio puede escoger mínimo un ítem de cada categoría de alimento incluida en la validación original (para la verificación de la implementación), y al menos un ítem representativo de cada una de las categorías diferentes de alimentos no analizados durante la validación (para la verificación en ítems). Es decir que, si el método de referencia declara que el ensayo fue validado para la categoría lácteos, el laboratorio puede seleccionar para realizar la verificación de la implementación para esta categoría, un ítem queso, o cualquiera otro que represente esta categoría.

Respecto de las categorías a validar, el laboratorio puede realizar su propia selección de las 15 categorías de alimentos las cuales se muestran en el anexo No. 1.

El alcance de la aplicación de laboratorio descrito anteriormente es para una "amplia gama de alimentos", lo que significa que, en caso de implementarse en un ejercicio de verificación, y el laboratorio ha incluido cinco o más categorías de alimentos en su estudio, puede declarar la aplicación para una "amplia gama de alimentos". Si el alcance de la aplicación de laboratorio es menor que el alcance de la validación, el laboratorio solo podrá declarar el alcance para aquellas categorías de alimentos evaluadas durante el ejercicio.

El anexo No. 2 proporciona orientación adicional sobre la selección de ítems (alimentos) desafiante de cada categoría (alimento) para emplear en un determinado ejercicio. Los ítems (alimentos) elegidos de cada categoría deben ser artículos que reflejen el tipo de muestras que se ensayan cotidianamente en el laboratorio y, en la medida de lo posible, deben contener componentes con propiedades antimicrobianas naturales, vitaminas, sabores y probióticos que puedan interferir con la detección del microorganismo objetivo.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

4.4.3. Características de desempeño

En los métodos de ensayos cualitativos, debe verificarse el LOD₅₀ estimado tanto en la etapa de verificación de la implementación, como en la fase de verificación de ítems (alimentos). En los métodos de ensayo cuantitativos, únicamente debe verificarse la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR}) durante la etapa de verificación de la implementación, mientras que la etapa de verificación de ítems (alimentos) únicamente debe verificarse la exactitud.

4.4.3.1. LOD₅₀ estimado

Como se expresó anteriormente, este atributo es requerido únicamente para los ensayos cualitativos, tanto en la fase de verificación de la implementación, como en la etapa de verificación en ítems (alimentos). Para la evaluación del LOD₅₀ estimado pueden implementarse 3 modelos:

El laboratorio debe seguir uno de los protocolos técnicos seleccionados que se describen a continuación en su totalidad para completar la verificación de la implementación, demostrando su capacidad para realizar la validación método correctamente. A continuación, el laboratorio aplicará este mismo protocolo técnico para la verificación en ítems (alimentarios).


Durante la verificación del método, ejecute el procedimiento completo del método como se describe, incluido el procedimiento de confirmación (si existe). Un mínimo de una porción de prueba individual a cada nivel de inoculación debe ser confirmado, y el número de colonias para la confirmación puede reducirse a una.

La tabla siguiente muestra para cada protocolo el número de porciones de prueba independientes a contaminar y ensayar, de acuerdo con el protocolo seleccionado.

PROTOCOLO	9XLOD ₅₀	3XLOD ₅₀	1XLOD ₅₀	3UFC – 5UFC	BLANCO	TOTAL
1	1	4	4		1	10
2		3	5		1	9
3				7	1	8

El laboratorio primero sigue uno de los protocolos técnicos seleccionados que se describen a continuación en su totalidad para completar la verificación de implementación, lo que demuestra su capacidad para realizar la validación.

La elección del protocolo depende de la capacidad del laboratorio para lograr el nivel deseado de contaminación de la porción de prueba. Se pueden utilizar cultivos de laboratorio o materiales de referencia para la inoculación

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

- El protocolo 1 se puede utilizar cuando no hay certeza de lograr el nivel deseado de contaminación de las porciones de prueba. Esto es relevante cuando se usa un cultivo, sin conocimiento previo del nivel real del inóculo, para inocular las porciones de ensayo.
- El Protocolo 3 se puede utilizar cuando se conoce el nivel de contaminación del inóculo, por ejemplo, cuando se utiliza un material de referencia con concentración conocida.
- El protocolo 2 se puede utilizar si el primer protocolo elegido no funcionó como se esperaba y el experimento debe repetirse.

Se pueden usar diluciones adicionales a las descritas en la tabla para cualquiera de los protocolos, con el propósito de minimizar la necesidad de repetir el experimento cuando los niveles de inoculación no cumplen con los requisitos o los resultados de la prueba de verificación no pueden interpretarse. Sin embargo, esto no es obligatorio.


Los protocolos deben realizarse de la siguiente manera:

- Preparar cultivos de los microorganismos diana para inocular los ítems (alimentos).
- Como mínimo, prepare la cantidad de porciones de prueba de este ítem (alimento) que se requieren para el protocolo seleccionado. Elija un ítem (alimento) que no esté naturalmente contaminado por el microorganismo objetivo.
- Inocular las suspensiones iniciales de las porciones de prueba de acuerdo con el protocolo seleccionado.
- Determinar el nivel del microorganismo diana en el inóculo, al mismo tiempo que se inoculan las porciones de prueba, colocándolo en un medio no selectivo (por ejemplo, agar de recuento en placa) o realizando una MPN. Enumerar de acuerdo con ISO 7218.

NOTA Si se desconoce el nivel del cultivo utilizado para la inoculación, se pueden inocular diluciones adicionales para garantizar que los niveles objetivo se incluyan en la verificación.

- Analizar las porciones de prueba inoculadas utilizando el procedimiento completo del método que se está verificando.
- Para el protocolo 1 y el protocolo 2: determine el eLOD₅₀ utilizando los resultados positivos y negativos obtenidos Ver numeral 4.4.3.3.3. Para el protocolo 3, no se determina eLOD₅₀. En cambio, los resultados se evalúan en función del número de positivos encontrados de las siete réplicas analizadas.

4.4.3.2. Selección de los ítems (alimentos)

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Se requiere un ítem (alimento) para la verificación de la implementación. Se puede seleccionar cualquier ítem (alimento) que esté incluido en la validación y dentro del alcance de la aplicación de laboratorio. Para la verificación del ítem (alimento), el laboratorio debe probar un mínimo de un ítem (alimento), preferiblemente uno desafiante, de cada una de las categorías incluidas en el alcance del ejercicio. El anexo N° 2 proporciona orientación sobre cómo elegir los artículos (alimentos) que suponen un desafío.

4.4.3.3. Contaminación artificial

4.4.3.3.1. Selección de cultivos

Las cepas pueden ser de:

- Colecciones de cultivos.
- Colecciones de laboratorio de usuarios
- Materiales de referencia (incluidos materiales de referencia comerciales, por ejemplo, una cepa liofilizada con concentración conocida).

Al elegir las cepas de prueba, la mayoría debe provenir de las categorías (de alimentos) seleccionadas para el estudio de verificación y cubrir el rango reconocido del analito objetivo con respecto a la diversidad en las características de identificación (por ejemplo, bioquímica, serotipo, tipo de fago), distribución geográfica e incidencia.


NOTA Preferiblemente, las cepas utilizadas en la verificación deben provenir de fuentes relevantes para el ítem (alimento) que se está verificando y se usa una cepa diferente para cada uno de los ítems (alimento) que se van a analizar.

4.4.3.3.2. Inoculación de las porciones de prueba

Utilice los datos del LOD₅₀ de las categorías (de alimentos) correspondientes del estudio de validación del método para determinar el nivel de contaminación (esto debe ser entre una y nueve veces el LOD₅₀, que se utilizará para inocular la porción de prueba. Para el protocolo 3, use 3 UFC a 5 UFC / porción de prueba.

Si no hay categorías (de alimentos) correspondientes disponibles en el estudio de validación, por ejemplo, para un ítem (alimento) desafiante probado en la verificación del ítem (alimento), se debe suponer que el valor LOD₅₀ es igual o inferior a 1 UFC / porción de prueba.

La siguiente guía se ofrece como un ejemplo de procedimientos adecuados para producir inóculos.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

La cepa seleccionada se cultiva en un medio de cultivo en condiciones que permitan el crecimiento óptimo de la cepa (por ejemplo, cultivo durante la noche). Siga los procedimientos especificados en el PROC-TC- 207 preparación de suspensiones microbianas

NOTA El cultivo durante la noche se especifica como de 16 a 24 h de incubación.

- Enumerar el cultivo en medio no selectivo para determinar la concentración de la cepa en UFC / ml. Se supone que este nivel se alcanzará de manera consistente cuando se emplean las mismas condiciones de cultivo.
- Repetir el cultivo en las mismas condiciones y tener en cuenta la concentración previamente determinada para preparar diluciones para cubrir el rango de inoculación. Este paso no es necesario si el laboratorio conoce la estabilidad de la cepa (por ejemplo, la viabilidad después del almacenamiento a 4 ° C durante la noche).


Si el laboratorio trabaja con cepas objetivo listas para usar con niveles conocidos (por ejemplo, material de referencia), los pasos descritos anteriormente no son necesarios.

El inóculo preparado se introduce directamente en la suspensión inicial de las porciones de ensayo individuales, teniendo en cuenta los niveles de concentración de desafío del inóculo en un volumen específico de diluyente, tal como se describe en PROC-TC-055 Procedimiento para el manejo de cepas. Después de la inoculación, la suspensión se mezcla completamente. Se recomienda el uso de cultivos estresados, pero no es obligatorio.

Se pueden probar más diluciones para garantizar que se incluyan los niveles objetivo. Utilice tantas diluciones como sea necesario, pero siempre tenga en cuenta un factor de dilución de 1: 3 entre los niveles.

Para determinar la concentración de inóculo requerida para la verificación de métodos tanto cualitativos como cuantitativos con una cantidad de microorganismo conocida se realiza según las indicaciones del PROC-TC- 207, (utilizando un medio no selectivo, por ejemplo, agar de recuento en placa). Tenga en cuenta que el nivel de contaminación del inóculo es muy bajo y, por tanto, se deben analizar más réplicas y/o un mayor volumen del inóculo para obtener un resultado válido. La concentración de los niveles bajo e intermedio utilizando el protocolo 1 o 2 se calcularán utilizando los recuentos obtenidos y los factores de dilución utilizados.

Alternativamente, se puede realizar una determinación de MPN de los inóculos usando un enfoque de MPN de 3 diluciones x 3 tubos; es adecuado el uso de un medio no selectivo para el enriquecimiento (p. ej., caldo de infusión de cerebro y corazón o caldo de tripton y soja) (consulte también el anexo C para obtener más información).

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

4.4.3.3.3. Evaluación de resultados


4.4.3.3.3.1. Determinación del LOD₅₀ estimado empleando el protocolo 1

Registre el número de resultados positivos obtenidos en cada nivel de inóculo y utilice la Tabla siguiente para determinar el eLOD₅₀. El blanco no producirá un resultado positivo. Si se obtiene un resultado positivo para el blanco, el experimento se repetirá para todos los niveles.

Para la evaluación de los resultados utilizando el protocolo 1, el inóculo de alto nivel (9 x LOD₅₀) producirá solo resultados positivos. Si se obtienen resultados negativos, el experimento se debe repetir para todos los niveles. Es muy poco probable que se produzcan algunas de las combinaciones de MPN indicadas como “resultado de MPN no confiable”, por lo tanto, en caso de que esto ocurra, se debe repetir el experimento.

Cuando se utilicen más diluciones, se utilizarán las tres diluciones, con el nivel de inoculación bajo más cercano al nivel LOD₅₀, para evaluar los datos de acuerdo con la Tabla.

Nivel de inoculación alto	Nivel de inoculación medio	Nivel de inoculación bajo	Blanco	LOD ₅₀ estimado
9 x LOD ₅₀ / porción de ensayo	3 x LOD ₅₀ / porción de ensayo	1 x LOD ₅₀ / porción de ensayo		UFC/porción de ensayo
1/1	4/4	4/4	0/1	< 1,0 x NIB ^a
1/1	4/4	3/4	0/1	= 0,5 x NIB
1/1	4/4	2/4	0/1	= 0,7 x NIB
1/1	4/4	1/4	0/1	= 1,0 x NIB
1/1	4/4	0/4	0/1	= 1,5 x NIB
1/1	3/4	4/4	0/1	= 0,7 x NIB
1/1	3/4	3/4	0/1	= 1,0 x NIB
1/1	3/4	2/4	0/1	= 1,3 x NIB
1/1	3/4	1/4	0/1	= 1,7 x NIB
1/1	3/4	0/4	0/1	= 2,3 x NIB
1/1	2/4	4/4	0/1	= 1,1 x NIB
1/1	2/4	3/4	0/1	= 1,5 x NIB
1/1	2/4	2/4	0/1	= 1,9 x NIB
1/1	2/4	1/4	0/1	= 2,6 x NIB
1/1	2/4	0/4	0/1	= 3,7 x NIB
1/1	1/4	4/4	0/1	Resultado MPN no confiable
1/1	1/4	3/4	0/1	= 2,1 x NIB
1/1	1/4	2/4	0/1	= 2,8 x NIB
1/1	1/4	1/4	0/1	= 4,0 x NIB

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Nivel de inoculación alto	Nivel de inoculación medio	Nivel de inoculación bajo	Blanco	LOD ₅₀ estimado
9 x LOD ₅₀ / porción de ensayo	3 x LOD ₅₀ / porción de ensayo	1 x LOD ₅₀ / porción de ensayo		UFC/porción de ensayo
1/1	1/4	0/4	0/1	= 6,3 x NIB
1/1	0/4	4/4	0/1	Resultado MPN no confiable
1/1	0/4	3/4	0/1	= 3,0 x NIB
1/1	0/4	2/4	0/1	= 4,3 x NIB
1/1	0/4	1/4	0/1	= 6,7 x NIB
1/1	0/4	0/4	0/1	= 14,0 x NIB

^aNIB: Nivel de inoculación Bajo

4.4.3.3.2. Determinación del LOD₅₀ estimado empleando el protocolo 2


Registre el número de resultados positivos obtenidos en cada nivel de inóculo y utilice la Tabla que se muestra más adelante para estimar el LOD₅₀.

El blanco no debe producir resultados positivos. Si se obtiene un resultado positivo para el nivel en blanco, el experimento se tendrá que repetir para todos los niveles.

Para la evaluación de los resultados mediante el protocolo 2, tanto los niveles de inoculación intermedios como bajos pueden tener resultados positivos y negativos. Cuando solo se obtengan resultados negativos, se tendrá que repetir el experimento. Es muy poco probable que se produzcan algunas de las combinaciones de MPN indicadas como "resultado de MPN no confiable" y, en este caso, se debe repetir el experimento.

Cuando se utilicen más diluciones, se deben utilizar las dos diluciones, con el nivel de inoculación bajo más cercano al LOD₅₀, para evaluar los datos de acuerdo con la Tabla siguiente

Nivel intermedio de inoculación 3 x LOD ₅₀ /porción de ensayo	Nivel de inoculación bajo 1 x LOD ₅₀ /porción de ensayo	Blanco	LOD ₅₀ estimado UFC/porción de ensayo
3/3	5/5	0/1	< 1,0 x NIB ^a
3/3	4/5	0/1	= 0,4 x NIB
3/3	3/5	0/1	= 0,7 x NIB
3/3	2/5	0/1	= 1,0 x NIB
3/3	1/5	0/1	= 1,4 x NIB
3/3	0/5	0/1	= 2,0 x NIB
2/3	5/5	0/1	= 0,7 x NIB
2/3	4/5	0/1	= 0,9 x NIB

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02


Nivel intermedio de inoculación 3 x LOD ₅₀ /porción de ensayo	Nivel de inoculación bajo 1 x LOD ₅₀ /porción de ensayo	Blanco	LOD ₅₀ estimado UFC/porción de ensayo
2/3	3/5	0/1	= 1,2 x NIB
2/3	2/5	0/1	= 1,6 x NIB
2/3	1/5	0/1	= 2,3 x NIB
2/3	0/5	0/1	= 3,7 x NIB
1/3	5/5	0/1	Resultado MPN no confiable
1/3	4/5	0/1	= 1,4 x NIB
1/3	3/5	0/1	= 1,8 x NIB
1/3	2/5	0/1	= 2,6 x NIB
1/3	1/5	0/1	= 4,1 x NIB
1/3	0/5	0/1	= 8,6 x NIB
0/3	5/5	0/1	Resultado MPN no confiable
0/3	4/5	0/1	Resultado MPN no confiable
0/3	3/5	0/1	= 2,9 x NIB
0/3	2/5	0/1	= 4,5 x NIB
0/3	1/5	0/1	= 9,4 x NIB

^aNIB: Nivel de inoculación Bajo

4.4.3.3.3. Determinación del LOD₅₀ estimado empleando el protocolo 3

No deben obtenerse resultados positivos para el blanco. Si se obtiene un resultado positivo para el blanco, el experimento se debe repetir para todos los niveles.

Los resultados del protocolo 3 solo deben utilizarse para la evaluación cuando el nivel de contaminación de las porciones de ensayo se encuentre dentro de los límites establecidos entre 3 UFC y 5 UFC / porción de ensayo. Este nivel de contaminación se determinará por enumeración o por MPN. Si el nivel de contaminación es mayor de 5 UFC / porción de ensayo, los resultados no se pueden utilizar y el experimento se deberá repetir. Si el nivel de contaminación es menor de 3 UFC / porción de ensayo y se alcanza el límite de aceptabilidad, se pueden utilizar los resultados. De lo contrario, se repetirá el experimento. No se estima ningún LOD₅₀ utilizando el protocolo 3. Los resultados se evalúan en función del número de positivos encontrados entre las siete réplicas analizadas.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

4.4.3.3.4. Límites de aceptabilidad

El LOD₅₀ estimado, determinado de acuerdo con el protocolo 1 o el protocolo 2 se debe comparar con el LOD₅₀ del estudio de validación. Para la verificación de la implementación, debe utilizarse el valor LOD₅₀ correspondiente al ítem (alimento) ensayado. Para la verificación de ítems (alimentos), el LOD₅₀ no debe ser mayor que 4 × LOD₅₀ observado en el estudio de validación. Si ningún valor de LOD₅₀ corresponde al ítem analizado (alimento), el LOD₅₀ estimado no debe ser mayor que 4 UFC / porción de ensayo. Este límite de aceptabilidad se basa en el valor teórico de un LOD₅₀ de 1 UFC / porción de ensayo.

Para el protocolo 3, debe obtenerse un mínimo de seis resultados positivos de las siete réplicas analizadas.


NOTAS:

- El LOD₅₀ estimado del estudio de verificación es válido y aceptable solo si se obtiene de la misma porción de ensayo o de una porción más pequeña (por ejemplo, 25 g, 100 ml, 375 g) utilizada en el estudio de validación.
- El LOD₅₀ estimado en el estudio de validación puede expresarse como UFC/g, UFC/ml o UFC/porción de ensayo. El LOD₅₀ de validación debe expresarse en UFC/porción de ensayo para poder comparar el resultado obtenido con el resultado del estudio de verificación.
- En los casos en que el LOD₅₀ estimado en el estudio de validación se exprese como UFC/g o UFC/ml, entonces el LOD₅₀ debe multiplicarse por el tamaño de la porción de ensayo utilizada. Por lo tanto, un LOD₅₀ de 0,1 UFC/g o UFC/ml dará un LOD₅₀ de 2,5 cuando se utilice una porción de ensayo de 25 g o 25 ml.
- Si, por ejemplo, el LOD₅₀ del estudio de validación es de 2,5 UFC/porción de ensayo, el valor máximo aceptable para el eLOD₅₀ será de 10 UFC/porción de ensayo (máximo de 4 × LOD₅₀).

4.4.3.3.5. Análisis de causa raíz

Cuando el resultado de la verificación excede los límites de aceptabilidad (por ejemplo, el LOD₅₀ estimado es mayor que 4 veces el LOD₅₀ observado en el estudio de validación), realice un análisis de la causa raíz para proporcionar una explicación de los resultados observados.

Puede ser útil volver a ejecutar la verificación de un método alternativo validado en paralelo con el método de referencia validado en el mismo alimento (ítem). Esto permite investigar si este ítem (alimento) se está desempeñando de manera similar para ambos métodos.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

El análisis de la causa raíz se debe realizar para determinar aspectos tales como (pero no limitadas a):

- Error analítico debido a prácticas de laboratorio deficientes.
- Error analítico en la aplicación del protocolo (por ejemplo, nivel de inoculación incorrecto).
- Especificidad del ítem (alimenticio), por ejemplo, ítems (alimentos) muy desafiantes que requirieron un factor de dilución más alto en la suspensión inicial.

Cuando se hayan identificado los problemas, implemente acciones correctivas y repita el experimento.

La información (basada en investigaciones, por ejemplo, análisis de causa raíz) se puede proporcionar en el informe del estudio de verificación para proporcionar una explicación de los hallazgos.

Cuando la verificación de un ítem (alimento) en particular no cumple con los límites de aceptabilidad, es recomendable que el laboratorio informe a la organización competente (por ejemplo, organismo de normalización, proveedor, organismo de certificación) según el método.

4.5. Atributos o características a evaluar en los métodos analíticos microbiológicos cuantitativos

4.5.1. Determinación de la reproducibilidad intralaboratorio


La determinación de la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio solo se aplica a la verificación de la implementación.

La verificación de la implementación se realiza en un solo laboratorio y la reproducibilidad se expresa como la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR}).

La determinación de la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR}) en la verificación de implementación corresponde a la determinación de la incertidumbre técnica, que es uno de los tres componentes principales de incertidumbre (técnica, matricial y distributiva) descritos en el procedimiento PROC-TC-002. Procedimiento de estimación de incertidumbres


Durante la verificación de la implementación, se debe ejecutar el procedimiento completo del método como se describe en los métodos de referencia (y por ende en los procedimientos internos), incluido el procedimiento de confirmación para cada porción de prueba individual.

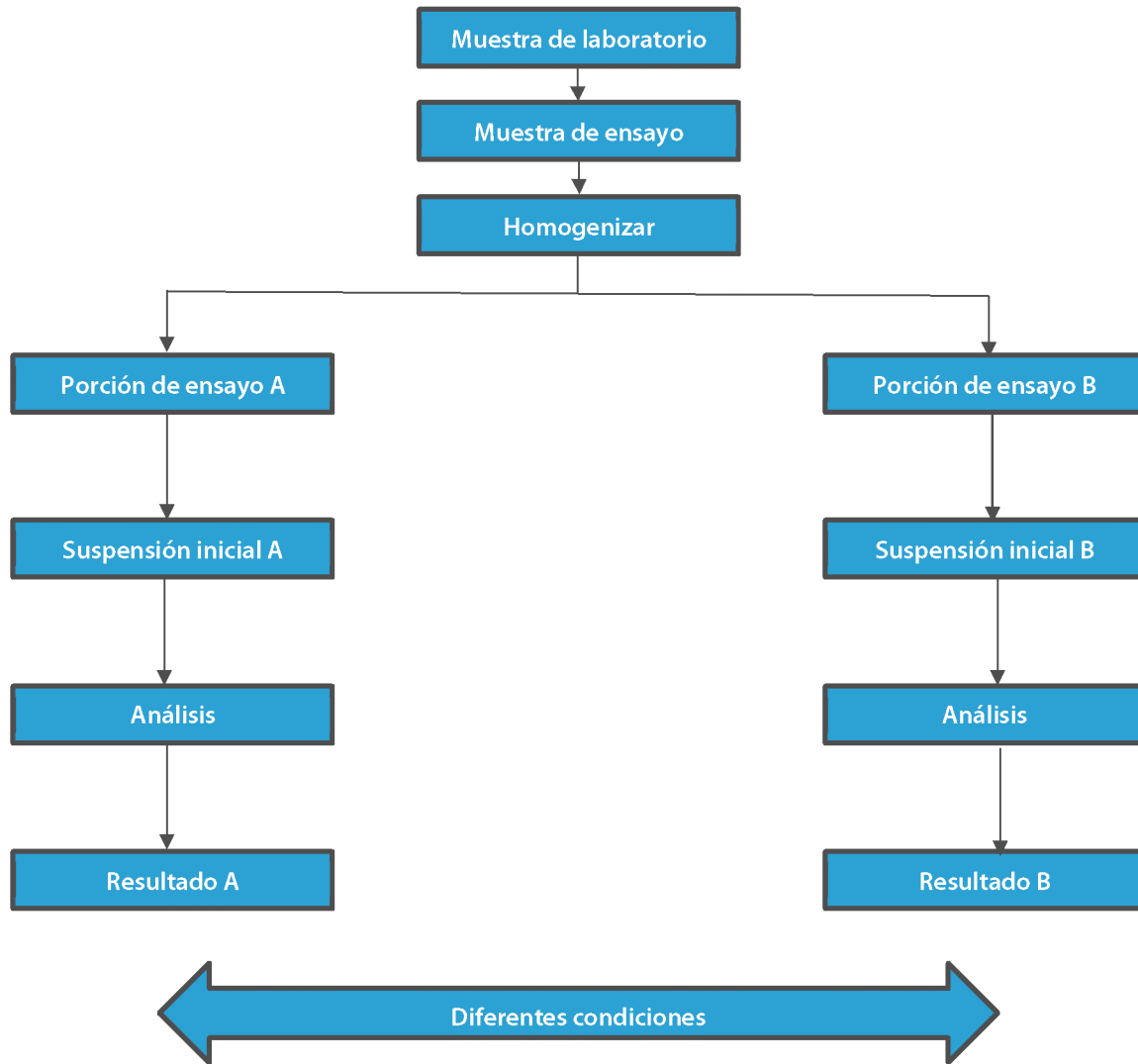
4.5.1.1. Diseño experimental

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

El protocolo se debe llevar a cabo de la siguiente manera.


- Se requiere un mínimo de 10 muestras de laboratorio, pertenecientes a un mismo ítem (alimento). Estos pueden ser de un número máximo de lotes diferentes en los casos en que el laboratorio esté realizando un servicio para una planta de producción o muestras provenientes de diferentes fabricantes para realizar la verificación en el laboratorio. Se pueden analizar más muestras para cubrir la posible pérdida de datos de algunas muestras debido a errores prácticos o contratiempos durante los ensayos.
- Los niveles de contaminación utilizados deben ser representativos del intervalo de contaminación natural encontrada en las muestras analizadas en el laboratorio.
- Cada muestra de laboratorio (o de ensayo) debe mezclarse u homogeneizarse antes de tomar dos porciones de prueba (ver la figura en la página siguiente). Esto es esencial para la distribución uniforme de los microorganismos. Para los productos líquidos, la mezcla se debe realizar agitando la muestra de laboratorio (o de ensayo) con la mano (por ejemplo, 25 veces a través de un arco de 25 cm). Para productos sólidos, la homogeneización se puede realizar por medios mecánicos, que podrían incluir stomachers y batidoras. Para obtener más información, siga las recomendaciones descritas en el PROC-TC- 199 Preparación de homogenizados y diluciones.
- Si se utiliza contaminación artificial, inocular la suspensión inicial de cada muestra de ensayo con un nivel conocido de la cepa.
- Las porciones de ensayo contaminadas naturalmente se pueden analizar directamente después de la homogeneización de la muestra de laboratorio (o de ensayo).

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02



La muestra de ensayo, tal como se define en el numeral 2.1, se utiliza con poca frecuencia en exámenes microbiológicos. La mayoría de las veces, la muestra de laboratorio se utiliza directamente para la homogeneización. Las condiciones de ensayo utilizadas en los análisis de la porción de ensayo A y la porción de ensayo B deberán variarse de tantas formas como sea posible dentro del alcance de la validación. Estos incluirán, a menos que el laboratorio usuario pueda justificar lo contrario, pero no se limitarán a:

- a) técnicos.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

b) lotes de medios de cultivo y reactivos (opcional: cuando sea pertinente, también se pueden utilizar diferentes cepas para inocular diferentes muestras de laboratorio).

c) aparatos (por ejemplo, incubadoras, mezcladores de vórtice, pipetas).

Se considera que las condiciones de prueba a) y b) causan la mayor variabilidad en los resultados de un método y deben variarse a menos que el laboratorio pueda justificar lo contrario. La condición de prueba c) debe variarse según la disponibilidad del aparato en el laboratorio. Si se puede demostrar que el ítem inoculado (alimento) es suficientemente estable, el análisis puede realizarse en días diferentes.

NOTA: Se pueden generar lotes de medios de cultivo a partir de diferentes preparaciones

4.5.1.2. Selección de ítems de alimentos

Se requiere un ítem (alimento) para la verificación de la implementación. La desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR}) 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 homogeneizarse eficazmente para minimizar la incertidumbre de la matriz.

4.5.1.3. Contaminación natural

Siempre que sea posible, use ítems contaminados naturalmente. Para el ítem (alimento) elegido, las porciones de ensayo individuales evaluadas deberán tener niveles de contaminación representativos del rango de contaminación natural encontrada en las muestras analizadas en el laboratorio.


Si el nivel esperado de contaminación natural es inferior a 10 UFC/g en la muestra de ensayo, se debe realizar contaminación artificial para cubrir el intervalo de aplicación del método.

4.5.1.4. Contaminación artificial

4.5.1.4.1. Selección del cultivo

La cepa puede provenir de:

- Una colección de cultivos.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

- Una colección de laboratorio.
- Un material de referencia (incluido material de referencia comercial, por ejemplo, una cepa liofilizada con concentración conocida).

NOTA Preferiblemente, la cepa utilizada en la verificación debe provenir de una fuente relevante para el ítem (alimento) que se está verificando.

4.5.1.4.2. Inoculación de la Porción de ensayo

Al inocular la porción de ensayo, los niveles de contaminación utilizados deben ser representativos del rango de contaminación natural que se encuentra en las muestras analizadas en el laboratorio. La siguiente guía es un ejemplo de procedimientos adecuados para producir inóculos.

- La cepa seleccionada se cultiva en un medio de cultivo en condiciones que permitan un crecimiento óptimo de la cepa (por ejemplo, cultivo durante la noche). Siga las instrucciones según PROC-TC- 207 Preparación de suspensiones microbianas.

NOTA En este documento, se describe el tratamiento del cultivo durante la noche el cual especifica el tiempo de incubación inicial de 16 a 24 h.

- Enumerar el cultivo en medios no selectivos para determinar la concentración de la cepa en UFC/ml. Se supone que este nivel se alcanzará de manera consistente cuando se utilicen las mismas condiciones de cultivo.
- Repetir el cultivo en las mismas condiciones y tener en cuenta la concentración previamente determinada para preparar diluciones que cubran el rango representativo de contaminación natural. Este paso no es necesario si el laboratorio conoce la estabilidad de la cepa (por ejemplo, la viabilidad después del almacenamiento a 4 ° C durante la noche).


NOTA: Si el laboratorio trabaja con cepas objetivo listas para usar con niveles conocidos (por ejemplo, material de referencia), los pasos descritos anteriormente no son necesarios.

El inóculo preparado se introduce directamente en la suspensión inicial de las porciones de ensayo individuales.

Después de la inoculación, la suspensión se mezcla completamente. Se recomienda el uso de cultivos estresados, pero no es obligatorio.

4.5.1.5. Evaluación de resultados

La desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR}) se calcula, en base a un mínimo de 10

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

muestras de laboratorio, según la fórmula:

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

Donde:

S_{IR} es la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio;

i es el índice de la muestra de laboratorio, $i = 1$ hasta n ($n \geq 10$);

n es el número de muestras;

y_{iA} , y_{iB} son los datos transformados logarítmicamente, en \log_{10} (UFC/g) o \log_{10} (UFC/ml), de las condiciones a, b y c, respectivamente.

4.5.1.6. Límites de aceptabilidad

La desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR}) del método verificado será menor que 2 veces el valor medio más bajo de la desviación estándar de reproducibilidad interlaboratorio (S_R) de los ítems (alimentos) utilizados en el estudio de validación. Cuando solo se determina un valor (S_R) en el estudio de validación, la (S_{IR}) del método verificado será menor que 2 veces la desviación estándar de reproducibilidad entre laboratorios (S_R).


4.5.1.7. Análisis de causa raíz

Cuando el resultado de la verificación no cumple con los límites de aceptabilidad, realice un análisis de la causa raíz para proporcionar una explicación de los resultados observados.

Puede ser útil volver a ejecutar la verificación de un método alternativo validado en paralelo con el método de referencia validado en este alimento (ítem). Esto es para investigar si este ítem (alimento) se está desempeñando de manera similar para ambos métodos.

El análisis de la causa raíz se debe realizar para determinar inquietudes tales como (pero no limitadas a):

- Error analítico debido a prácticas de laboratorio deficientes;

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

- Error analítico en la aplicación del protocolo (por ejemplo, nivel de inoculación incorrecto).

Cuando se hayan identificado los problemas, implemente acciones correctivas y repita el experimento.

La información (basada en investigaciones, por ejemplo, análisis de causa raíz) puede ser documentada en el informe del estudio de verificación para proporcionar una explicación de los hallazgos.

Cuando la verificación de un ítem (alimento) en particular no cumple con los límites de aceptabilidad, se recomienda que el laboratorio informe a la organización competente (por ejemplo, organismo de normalización, proveedor, organismo de certificación) según el método.

4.5.2. Determinación de la exactitud


La estimación de la exactitud solo se requiere para la verificación de ítems (alimentos).

Durante la verificación del ítem (alimento), ejecute el ensayo completo del método como se describe en el procedimiento, incluido el procedimiento de confirmación (si hay uno) para cada porción de ensayo individual.

4.5.2.1. Diseño experimental

El protocolo por seguir es el siguiente.

- Seleccione el (los) ítem (s) (alimentos) para el ensayo.
- Contamine artificialmente el (los) ítems (s) (alimentos) en tres niveles de inoculación que cubran el intervalo de aplicación del método por parte del laboratorio. La contaminación artificial debe realizarse en la suspensión inicial. Cada nivel se realiza por duplicado. Preferiblemente, usar una muestra de laboratorio o un lote de producto (alimento) diferente del mismo ítem para cada uno de los tres niveles de inoculación.
- Enumere, utilizando el método a verificar, el ítem (alimento) contaminado artificialmente y la suspensión (cultivo puro) utilizada para inocular el ítem (alimento).
- Analice la porción de ensayo sin inocular para cada muestra o lote de laboratorio para determinar el nivel de contaminación natural que contiene el ítem. Los resultados de estos controles negativos se registran y pueden proporcionar información útil cuando se requiere un análisis de la causa raíz.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

4.5.2.2. Selección de ítems (alimentos)

Para la verificación del ítem (alimento), el laboratorio debe probar un mínimo de un ítem (alimento), preferiblemente uno desafiante, de cada una de las categorías (alimentos) requeridas. Los detalles sobre el número requerido de categorías (de alimentos) para analizar de acuerdo con el alcance de la validación o el alcance de la aplicación de laboratorio se describieron en el numeral 4.5.1.2.

4.5.2.3. Contaminación artificial

4.5.2.3.1. Selección de cultivos

Las cepas pueden ser de:

- Colecciones de cultivos.
- Colección de laboratorio del usuario.
- Materiales de referencia (incluidos materiales de referencia comerciales, por ejemplo, una cepa liofilizada con concentración conocida).

Al elegir las cepas de prueba, la mayoría debe provenir de las categorías (de alimentos) seleccionadas para el estudio de verificación y cubrir el rango reconocido del analito objetivo con respecto a la diversidad en las características de identificación (por ejemplo, bioquímica, serotipo, tipo de fago), distribución geográfica e incidencia.


NOTA: Preferiblemente, las cepas utilizadas en la verificación provienen de fuentes relevantes para el artículo (alimento) que se está verificado y se utiliza una cepa diferente para cada uno de los ítems (alimentos) que se van a analizar.

4.5.2.3.2. Inoculación de los ítems de ensayo

Al inocular las porciones de ensayo, los tres niveles de contaminación utilizados deben ser representativos del rango de contaminación natural que se encuentra en las muestras analizadas en el laboratorio.

NOTA 1 Si el laboratorio del usuario establece más de tres niveles de inóculo (por ejemplo, cinco o seis), es más probable que obtenga los tres niveles requeridos para los estudios de comparación.

La siguiente guía se ofrece un ejemplo de procedimientos adecuados para producir inóculos.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

- La cepa seleccionada se cultiva en un medio de cultivo en condiciones que permitan su crecimiento óptimo (por ejemplo, cultivo durante la noche). Siga las recomendaciones procedimientos especificados en PROC-TC- 207.
- **NOTA 2** El cultivo durante la noche se especifica como de 16 a 24 h de incubación.
- Repetir el cultivo en las mismas condiciones y tener en cuenta la concentración previamente determinada para preparar diluciones para cubrir el rango de intervalo de contaminación establecido en el plan. Este paso no es necesario si el laboratorio conoce la estabilidad de la cepa (por ejemplo, la viabilidad después del almacenamiento a 4 ° C durante la noche).

Si el laboratorio trabaja con cepas listas para usar con niveles conocidos (por ejemplo, material de referencia), los pasos descritos anteriormente no son necesarios.

El inóculo preparado se introduce directamente en la suspensión inicial de las porciones de ensayo individuales.

Después de la inoculación, la suspensión se mezcla completamente. Se recomienda el uso de cultivos estresados, pero no es obligatorio.

4.5.2.4. Evaluación de resultados


Compare los resultados obtenidos del ítem (alimento) contaminado artificialmente con los resultados arrojados por la suspensión del inóculo [que es la suspensión específica (diluida) utilizada para contaminar la suspensión inicial del ítem (alimento)]. Tanto el producto (alimenticio) como la suspensión de inóculo específico (diluido) se analizan utilizando el método que se está verificando.

Para la comparación, los resultados del ítem (alimento) se expresarán en log₁₀ UFC/porción de ensayo y los resultados de la suspensión de inóculo se expresarán en log₁₀ UFC/ml.

Los resultados de la porción de prueba sin inocular (control negativo) proporcionan información sobre el nivel de contaminación natural, si está presente, del ítem (alimento) con los microorganismos objetivo.

4.5.2.5. Límites de aceptabilidad

Se espera que, en cada nivel, la diferencia absoluta entre los resultados del ítem (alimento) contaminado artificialmente en log₁₀ UFC/porción de ensayo y el de la suspensión de inóculo sea igual o inferior a 0,5 log₁₀. Sin embargo, este puede no ser el caso si el ítem (alimento) utilizado está naturalmente contaminado antes de la inoculación. Los resultados de las porciones de ensayo no inoculadas (controles negativos) pueden ayudar cuando se requiere un análisis de la causa raíz.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

4.5.2.6. Análisis de causa raíz

Cuando el resultado de la verificación no cumple con los límites de aceptabilidad, realice un análisis de la causa raíz, de acuerdo con las directrices establecidas en PROC-GC-007 Procedimiento de acciones correctivas. para proporcionar una explicación de los resultados observados.

Puede ser útil volver a ejecutar la verificación de un método alternativo validado en paralelo con el método de referencia validado en este alimento (ítem). Esto es para investigar si este ítem (alimento) se está desempeñando de manera similar para ambos métodos.

El análisis de la causa raíz se debe realizar para determinar aspectos tales como (pero no limitadas a):

- Error analítico debido a prácticas de laboratorio deficientes
- Error analítico en la aplicación del protocolo (por ejemplo, nivel de inoculación incorrecto).

Cuando se hayan identificado los problemas, implemente acciones correctivas, siguiendo los lineamientos establecidos en PROC-GC-007 Procedimiento de acciones correctivas. y repita el experimento.

Se puede proporcionar información (basada en investigaciones, por ejemplo, análisis de causa raíz) en el informe de verificación para proporcionar una explicación de los hallazgos cuando la exactitud estimada es mayor que 0,5 log₁₀ UFC/g.


Cuando la verificación de un ítem (alimento) en particular no cumpla con los límites de aceptabilidad, se recomienda que el laboratorio usuario informe a la organización competente (por ejemplo, organismo de normalización, proveedor, organismo de certificación) según el método.

4.5.3. Métodos alternativos validados de confirmación y tipificación

La verificación de métodos alternativos validados de confirmación y tipificación solo requiere verificación de implementación. La muestra es una colonia aislada en placas de agar definidas selectivas o no selectivas.

4.5.3.1. Verificación de implementación

La verificación de la implementación tiene como objetivo demostrar la competencia del laboratorio para realizar la confirmación alternativa validada o el método de tipificación. Esto se logra demostrando la capacidad del laboratorio para obtener los resultados

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

esperados en una colonia aislada a partir de agar (es) selectivos o no selectivos especificados.

El laboratorio debe:

- Revisar los datos de validación del método (los datos de validación pueden obtenerse del informe de validación de métodos alternativos).
- Seleccionar una placa de agar selectivo probada durante el estudio de validación que, si es posible, pertenezca al alcance del laboratorio.
- Utilizar esta placa de agar selectivo para realizar la verificación de la implementación. Si no se probó una placa de agar selectivo, seleccione y use una placa de agar no selectivo probada durante el estudio de validación para realizar la implementación.

4.5.3.2. Diseño experimental

Para la verificación de la implementación, el número de cepas a probar se da en la Tabla a continuación:


NIVEL DE CONFIRMACIÓN	ESTUDIO DE INCLUSIVIDAD	ESTUDIO DE EXCLUSIVIDAD
Familia	5	5
Género		
Especie		
Subtipo (serotipo)		

La tabla anterior muestra que en el estudio de inclusividad (y/o exclusividad), deben incluirse 5 cultivos a Nivel de confinación de familia, género, especie y subtipo, dependiendo del alcance del ejercicio.

4.5.3.3. Selección de cultivos

Las cepas pueden ser de:

- Colecciones de cultivos.
- Colección de laboratorio.
- Materiales de referencia (incluidos materiales de referencia comerciales, por ejemplo, cepas liofilizadas).

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Al elegir las cepas de prueba, la mayoría debe provenir de las categorías (de alimentos) dentro del alcance de la aplicación de laboratorio y cubrir el rango reconocido del analito objetivo con respecto a la diversidad, en las características de identificación, p. ej. bioquímico, serotipo, tipo de fago, distribución geográfica e incidencia.

Para la verificación de la implementación, seleccione cinco cepas objetivo y cinco cepas no objetivo para el estudio de inclusividad y exclusividad, respectivamente. La selección de las cepas puede basarse en las cepas probadas en el estudio de validación. Las cepas de exclusividad serán pertinentes (por ejemplo, *L. innocua* se seleccionará para un método de confirmación alternativo validado de *L. monocytogenes*).

4.5.3.4. Evaluación de resultados

Ensaye las cepas de inclusividad y exclusividad seleccionadas de acuerdo con la confirmación alternativa validada o el método de tipificación que se está verificando.


Tabular los resultados de los estudios de inclusión y exclusividad como se muestra en la Tabla 15. Informe los acuerdos y desviaciones entre la confirmación esperada o el resultado de tipificación y el resultado de la confirmación o el método de tipificación que se está verificando.

Cultivos ensayados	Inclusividad/Exclusividad	Características del cultivo	Confirmación esperada/ resultado de la tipificación	Resultado de la confirmación/ Método de tipificación que se confirma	Interpretación
1					
2					
9					
10					

^a Acuerdo o desviación entre el resultado esperado y el resultado de la confirmación probada o el método de tipificación.

NOTA Las características de las cepas individuales son como mínimo: el nombre de la cepa, el número de colección (cultivo) y el origen de la cepa. También se pueden agregar otras características disponibles.

4.5.3.5. Límites de aceptabilidad

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

El resultado de la confirmación alternativa o el método de tipificación que se verifica será el mismo que el resultado de confirmación o tipificación esperado para todas las cepas analizadas. Por tanto, debería haber un 100% de acuerdo.

4.5.3.6. Análisis de causa raíz

Cuando el resultado no cumple con el límite de aceptación, realice un análisis de la causa raíz para proporcionar una explicación de los resultados observados.

El análisis de la causa raíz se debe realizar, siguiendo los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-GC-007 Procedimiento de acciones correctivas, para determinar inquietudes tales como (pero no limitadas a):

- Error analítico debido a prácticas de laboratorio deficientes.
- Error analítico en la aplicación del protocolo (por ejemplo, tiempo o temperatura de incubación incorrectos).
- La formulación de medios de cultivo / medios.
- La identidad correcta de las cepas de prueba.

4.6. Atributos o características a evaluar en los métodos analíticos microbiológicos. Cualitativos para industrias diferentes a alimentos


Las imperfecciones técnicas y otros factores son responsables de variaciones adicionales. Las determinaciones paralelas varían incluso más de lo que explica la distribución de *Poisson*. Esta situación se llama sobredispersión y sigue un modelo de distribución de probabilidad llamado *distribución binomial negativa*. La sobredispersión es la manera en la cual se comportan habitualmente las determinaciones microbiológicas.

AOXLAB S. A. S., evalúa los siguientes atributos o características a los métodos analíticos microbiológicos implementados en el laboratorio:

4.6.1. Determinación de la sensibilidad, especificidad, eficiencia, selectividad y tasas de falsos positivos y de falsos negativos

4.6.1.1. Muestras para utilizar

A menos que el método de referencia especifique otro valor, deben prepararse muestras apropiadas que contengan de 20 a 80 unidades formadoras de colonias (de 10 a 60 UFC de organismos objetivo) por porción de ensayo. A continuación, se analizan las muestras siguiendo el procedimiento de ensayo interno. Se recuentan las colonias típicas y atípicas (es decir, las que tienen el aspecto típico del organismo objetivo y las que no tienen dicho aspecto típico del organismo objetivo). Se identifican todas las colonias, tanto típicas

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

como atípicas, utilizando para ello un procedimiento adecuado que puede incluir kits comerciales de identificación microbiana, técnicas de secuenciación de ADN u otros métodos apropiados.

El método de preparación de las muestras debe realizarse siguiendo las instrucciones establecidas en el método de ensayo a validar o verificar. Es preferible utilizar muestras con contaminación natural con un nivel apropiado de organismos objetivo, si se encuentran disponibles. No obstante, en muchos casos no es posible contar con muestras naturalmente contaminadas. En tales casos puede utilizarse para la preparación de muestras, material contaminado en laboratorio por adición de microorganismos, utilizando cepas apropiadas de los organismos objetivo y no objetivo, (para la evaluación de la selectividad), con una concentración de partículas conocida. El nivel de concentración al cual debe contaminarse la muestra con microorganismos no objetivo debe ser similar al que se encuentra habitualmente en las matrices evaluadas en el ejercicio.


Debe tenerse en cuenta que el uso de materiales de referencia y las cepas utilizadas, tienen una influencia directa sobre el resultado del experimento.

El número de muestras a ensayar debe ser como mínimo veinte, de las cuales entre el 25% y el 50% deben contener el microorganismo objetivo y el resto no lo deben contener. De ser posible, las muestras deben ser procedentes de distintos orígenes.

4.6.1.2. Estimación de los atributos de categoría

Cuando el método incluye una etapa de verificación, los datos de identificación pueden dividirse en cuatro categorías:

- a. número de colonias típicas confirmadas como el organismo de ensayo en el ensayo confirmativo primario, cuya identidad viene soportada por la prueba de identificación secundaria (verdaderos positivos);
- b. número de colonias atípicas, o de colonias típicas que son negativas en el primer ensayo confirmatorio identificadas como del organismo objetivo en la prueba de identificación secundario (falsos negativos);
- c. número de colonias típicas confirmadas como del organismo objetivo en el ensayo confirmativo primario y que posteriormente se determina que no pertenecen al organismo objetivo por la prueba de identificación secundario (falsos positivos);
- d. número de colonias atípicas o de colonias típicas que son negativas en el ensayo primario de confirmación que posteriormente a través de la prueba de identificación secundaria se demuestra que no son del organismo objetivo (verdaderos negativos);

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Para métodos sin procedimiento de confirmación, los datos de identificación pueden dividirse en cuatro categorías:

- número de colonias típicas identificadas como del organismo objetivo a través de una prueba de identificación externo (verdaderos positivos);
- número de colonias atípicas identificadas como del organismo objetivo a través de una prueba de identificación externo (falsos negativos);
- número de colonias típicas identificadas como no pertenecientes al organismo objetivo a través de un ensayo de identificación externo (falsos positivos);
- número de colonias atípicas identificadas como no pertenecientes al organismo objetivo a través de un ensayo de identificación externo (verdaderos negativos).

Las frecuencias de estas categorías pueden expresarse en una matriz de 2 x 2.

Recuento confirmado		Recuento presuntivo		
		+	-	
	+	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a+b</i>
	-	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>c+d</i>
		<i>a+c</i>	<i>b+d</i>	<i>n = a+b+c+d</i>

La sensibilidad, especificidad, selectividad, tasas de falsos positivos y de falsos negativos para el organismo de ensayo pueden calcularse de la siguiente manera:

$$\text{Sensibilidad} = a / (a + b)$$

$$\text{Especificidad} = d / (c + d)$$

$$\text{Tasa de falsos positivos} = c / (a + c)$$

$$\text{Tasa de falsos negativos} = b / (b + d)$$


$$\text{Selectividad} = a / n$$

$$\text{Eficiencia} = (a + d) / n$$

El recuento confirmado se refiere a los organismos caracterizados por un cierto método, descritos en el procedimiento como los organismos objetivo u obtenidos a partir de cepas certificadas. Para una evaluación de la selectividad apropiada, las muestras deben contaminarse tanto con el microorganismo objetivo, como con un microorganismo no objetivo, similar, de acuerdo con el alcance del método de ensayo (Familia, orden, género, especie).

De manera general y salvo que el método de referencia indique otros valores, pueden emplearse los criterios siguientes para evaluar los resultados obtenidos de este ejercicio:

- **Sensibilidad:** generalmente superior al 90%.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

- **Especificidad:** generalmente superior al 80%.
- **Selectividad:** en general, los resultados no son válidos si la selectividad es inferior al 10%.

Además de los atributos anteriores, puede evaluarse mediante el índice *Kappa* de *Cohen*. Este índice evalúa la probabilidad de que el acuerdo entre los valores obtenidos y los valores asignados haya sido por azar. El índice *Kappa* se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$K = (P_o - P_e) / (1 - P_e)$$

$$P_o = (a+d)/n$$

$$P_e = ((a+c) \times (a+b)) + ((b+d) \times (c+d)) / n^2$$

Como criterio general de calidad, el valor de *K* debe ser superior a 0.75

4.6.2. Límite de detección e intervalo de trabajo

A concentraciones de partícula muy bajas, todos los métodos microbiológicos, MPN y recuento de colonias, se convierten esencialmente en métodos Presencia - Ausencia. En lo relacionado con la evaluación de la calidad del producto, hay poco impacto al considerar cualquier conteo por debajo de tres o cuatro unidades formadoras de colonia (UFC) como meras detecciones positivas de presencia.

Si el límite de detección se define en términos de la probabilidad de obtener un resultado positivo, la probabilidad de un resultado positivo cuando prevalece la distribución de Poisson se puede calcular a partir de

$$P(+)=1-e^{-m}$$

Donde *m* corresponde al promedio de partículas (UFC) por alícuota y *e* es la base de los logaritmos naturales.

Resolviendo la ecuación para *x*, se tiene que:


$$x = -\ln(1 - p(+))$$

Una definición usual del nivel de detección es la concentración a la cual la probabilidad de detectar la presencia del analito es igual a 95% [*p*(+) = 0,95].

Según la ecuación

$$x = -\ln(1 - 0.05) = 3$$

Por consiguiente, para un recuento medio de 3 (partículas por porción de ensayo), las posibilidades de detectar la presencia del analito son iguales a 0,95 (a condición de que prevalezca la distribución de Poisson).

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

En el caso en que se asume la existencia de sobredispersión, El nivel de detección, cuando se define en términos de probabilidad, también puede calcularse a partir de la probabilidad de un resultado negativo. La probabilidad de un resultado negativo (probabilidad de un cero) viene dada por la fórmula:

$$p_0 = (1 + u_0^2 \times c)^{-1/u_0^2}$$

despejando c se obtiene el límite de detección cuando se ha dado la probabilidad de negativos y la desviación estándar operacional relativa (u_0).

La resolución de esta ecuación para \bar{x} proporciona el nivel de detección cuando la probabilidad (frecuencia relativa) de negativos y la varianza operativa relativa han sido indicadas.

$$\bar{x} = \frac{p(-)^{-u_0^2} - 1}{u_0^2}$$

La concentración bacteriana requerida para alcanzar un 95% de probabilidad de un resultado positivo en una situación de sobredispersión depende de la varianza operativa relativa. Si se asume una desviación estándar operacional relativa $u_0 = 0,30$. La sustitución directa de la probabilidad de un resultado negativo $p(-) = 1 - p(+) = 1 - 0,95 = 0,05$ en la fórmula anterior resulta en


$$\bar{x} = \frac{0.05^{-0.30^2} - 1}{0.30^2} = 3.44$$

Teniendo en cuenta lo anterior, el límite de detección debe elegirse en algún lugar cerca de 20 UFC por conjunto de detección. En ese número de colonias, el coeficiente de variación en una situación completamente aleatoria (Poisson) es aproximadamente del 25%. Si se conoce numéricamente la sobredispersión, la determinación del límite inferior de determinaron puede basarse en el modelo binomial negativo

Para el nivel de detección de métodos NMP, es posible aplicar el mismo razonamiento que en el caso de los métodos de recuento de colonias. La probabilidad de detección del analito en los sistemas NMP viene dado por el modelo de distribución de Poisson. Independientemente de la configuración geométrica, se necesita el mismo número medio de partículas en el sistema para garantizar la detección del analito con una probabilidad seleccionada.

Dado que los límites superiores son teóricos, el enfoque implementado por el laboratorio consiste en realizar una verificación de la cantidad mínima de partículas que es posible detectar con el método de ensayo en una matriz dada.

Para esto, deben ensayarse mínimo tres niveles de concentración del microorganismo en cada matriz. El nivel más alto de concentración debe estar por encima del nivel de detección propuesto, el nivel medio debe ser igual al nivel propuesto y el nivel inferior debe ser inferior al nivel de detección propuesto. Por ejemplo, si el nivel de detección que

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

se propone verificar es de 5 UFC/g, pueden prepararse ensayos a niveles de concentración de 10 UFC/g, 5 UFC/g y 1 UFC/g. El número de porciones analíticas a preparar varía según el nivel de confiabilidad con el cual se desea verificar el nivel de detección. Si el nivel de probabilidad que desea verificarse es del 90%, deben prepararse y ensayarse mínimo 10 réplicas. Si el nivel de probabilidad que desea verificarse es del 95%, deben prepararse 20 porciones analíticas de la matriz. El nivel de verificación se establecerá como aquel nivel de concentración en el cual se haya detectado positivamente el microorganismo en una proporción de réplicas igual a la probabilidad de detección preestablecida. (90% o 95% de las réplicas).

4.6.3. Linealidad

La linealidad o proporcionalidad del detector busca establecer el límite superior para el ensayo. Para esto, se debe contar con una dilución apropiada de la muestra y a partir de ella realizar diluciones sucesivas 1:2, hasta obtener un conjunto de ensayos cuya concentración del microorganismo abarque el rango de trabajo que se pretende evaluar. Para cada dilución se elaboran 3 placas paralelas y se incuban de acuerdo con las condiciones establecidas para el método de ensayo. Con los datos obtenidos se calcula el índice de relación de probabilidad logarítmica G^2 , de acuerdo con la siguiente ecuación:


$$G_{n-1}^2 = 2 \times \left[c_1 \ln \frac{c_1}{R_1} + c_2 \ln \frac{c_2}{R_2} + c_3 \ln \frac{c_3}{R_3} + \dots + c_n \ln \frac{c_n}{R_n} - \sum c \times \ln \frac{\sum c}{\sum R} \right]$$

Donde G_{n-1}^2 es el índice de relación de probabilidad logarítmica, c es la sumatoria del recuento de las placas sembradas por dilución y R es el volumen relativo, que debe concordar con la serie geométrica .../32/16/8/4/2/1.

El valor de índice de relación de probabilidad logarítmica se compara con el valor crítico de la distribución X^2 con $n-1$ grados de libertad y un valor p de 0.1%. si el valor de G_{n-1}^2 supera el valor crítico de X^2 , indica que hay pérdida de linealidad en el rango evaluado.

Alternativamente, puede comprobarse la linealidad a partir de preparaciones de matrices contaminadas con un inóculo del microorganismo objetivo, obtenido a partir de un material de referencia cuantitativo, o estandarizado mediante la escala de McFarland. Deben ensayarse mínimo en 5 niveles de concentración uniformemente repartidos a lo largo del intervalo de concentraciones en las cuales se quiere evaluar el método. Por cada nivel de concentración, deben realizarse mínimo tres ensayos.

Una vez tenidos los resultados, se realiza una gráfica de Valor experimental obtenido vs valor teórico y obtenerse el modelo de ajuste lineal por el método de los mínimos cuadrados, siguiendo las instrucciones establecidas en el numeral 4.3.2.2. Al igual que en dicho apartado, para demostrar la linealidad del método, debe obtenerse una recta con pendiente igual a 1 e intercepto igual a cero.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

4.6.4. Precisión

Del mismo modo que en los métodos de ensayo fisicoquímicos, la precisión de los métodos de ensayo microbiológico puede evaluarse como repetibilidad y precisión intermedia

4.6.4.1. Repetibilidad

El diseño para la evaluación del atributo de repetibilidad consiste en analizar 10 replicados de la misma muestra en condiciones de repetibilidad. Es decir, el mismo técnico, en el mismo día, a la misma hora aproximadamente e incubando todas las muestras en la misma estufa.

Deben prepararse un mínimo de tres series de datos de repetibilidad, utilizando tres fuentes diferentes del microorganismo objetivo. De ser posible, utilizar muestras naturales.

Una vez se tienen los resultados, se calcula la media para cada muestra, de acuerdo con:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Donde \bar{x} Es el promedio, x_i es cada uno de los datos replicados y n es el número de réplicas. (en este caso $n=10$).

Así mismo, se estima la varianza para cada muestra, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Teniendo estos valores, para cada muestra se calcula la varianza operativa relativa, de acuerdo con:

$$u_0^2 = \frac{s^2}{\bar{x}^2}$$


La expresión final de la repetibilidad en porcentaje puede deducirse a partir de la siguiente fórmula

$$u_0 = 100 \times \sqrt{u_0^2}$$

Donde $\overline{u_0^2}$ corresponde al promedio de la varianza operativa relativa de las muestras.

4.6.4.2. Reproducibilidad intralaboratorio

La reproducibilidad intralaboratorio o precisión intermedia, se evalúa realizando series de replicados, en condiciones lo más diferentes posible, dentro del laboratorio, siempre y cuando la variación de dichas condiciones represente la cotidianidad. En el Laboratorio,

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

es posible evaluar realizarse ensayos, por ejemplo, con diferentes analistas, diferentes estufas y diferentes lotes de medio.

El ensayo analítico completo se replica utilizando máxima variación de los parámetros de laboratorio. Siempre que sea posible deben estudiarse muestras naturales. Debe contarse con un mínimo de 30 muestras.

La estimación de la precisión intermedia puede llevarse a cabo implementando un diseño experimental similar al descrito en el numeral 4.3.3, salvo que debe contarse con entre 6 y 15 muestras por cada matriz, con concentraciones distribuidas a lo largo del rango de aplicación del método. Estas muestras deben procesarse en dos lotes de ensayo, de manera simultánea. El primer lote se procesará empleando las condiciones rutinarias de análisis. El segundo lote se procesa modificando la fuente de variabilidad que se desea evaluar. (Analista, Incubadora, Equipo de detección, etc.).

Para el caso de métodos de ensayo de Número Más Probable, (NMP), además de tener lecturas duplicadas de 10 muestras, es necesario contar con los límites de confianza superior e inferior, para cada determinación.

La reproducibilidad intralaboratorio para cada muestra se calcula con la siguiente ecuación

$$u_{R'}^2 = \frac{(\ln(M_1) - \ln(M_2))^2}{2}$$

Donde M_1 y M_2 son los resultados de la réplica 1 y 2 de cada muestra respectivamente.

La variabilidad intrínseca para cada resultado se calcula mediante las siguientes ecuaciones:

$$u_{d1}^2 = \frac{\ln(T_{1,1}) - \ln(T_{0,1})}{2 \times 1.96}$$

$$u_{d2}^2 = \frac{\ln(T_{1,2}) - \ln(T_{0,2})}{2 \times 1.96}$$


Donde $T_{1,1}$ y $T_{0,1}$ son los límites de confianza superior e inferior para el resultado M_1 y $T_{1,2}$ y $T_{0,2}$ son los límites de confianza superior e inferior para el resultado M_2

La variabilidad intrínseca media u_d^2 es calculada como el promedio de u_{d1}^2 y u_{d2}^2 .

la varianza operativa relativa u_0^2 para cada par de recuentos, se calcula como:

$$u_0^2 = u_{R'}^2 - u_d^2$$

Finalmente, se calcula la varianza operativa relativa media a partir de la serie de pares de resultados NMP obtenidos a partir de las diferentes muestras sometidas a ensayo. La expresión final u_0 en condiciones de reproducibilidad intralaboratorios (en %) es la raíz cuadrada de la varianza operativa relativa media, multiplicada por 100.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

El cálculo del límite de precisión del método de ensayo a utilizar en el control de calidad analítico se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$PI = 2.8 \times u_0$$

4.6.5. Veracidad

La recuperación absoluta (veracidad) de analitos microbiológicos es imposible de medir, lo que es un problema en la validación primaria de un nuevo método analítico.

La recuperación real puede aproximarse ensayos en por lo menos 15 muestras las cuales se parten en cuatro porciones analíticas. La primera se ensayará tal como se encuentra y las otras tres serán contaminadas a tres niveles de concentración, uniformemente distribuidos en el rango de aplicación del método, con un inóculo del microorganismo objetivo, obtenido a partir de un material de referencia cuantitativo, o estandarizado a través de la escala de McFarland. Cada porción analítica debe ensayarse por duplicado.

El sesgo relativo se evalúa como porcentaje de recuperación, el cual se calcula como:

$$R\% = \frac{x' - x}{x_{Adc}} \times 100$$

Donde x' es el valor promedio de las adiciones obtenido experimentalmente, x el valor medio de la concentración media del analito presente en las muestras sin adicionar y x_{Adc} corresponde al valor teórico de la adición realizada sobre la porción analítica.

El sesgo medio del método puede evaluarse en función de la cantidad de analito, como el promedio de las recuperaciones por cada nivel de concentración, o de manera global del método, a partir del promedio de todas las recuperaciones obtenidas en los ensayos.


4.6.6. Robustez

La evaluación de la robustez de los métodos analíticos microbiológicos se realiza de acuerdo con las directrices dadas para los métodos de ensayo fisicoquímico en el numeral 4.3.6. Dependiendo de las condiciones del ensayo y del laboratorio, resulta importante en el diseño experimental de *Youden - Steiner*, la homogeneidad de temperatura en la incubadora, la temperatura de incubación y el tiempo de incubación, entre otros factores.

4.6.7. Estimación de la incertidumbre

La estimación de la incertidumbre de los resultados de análisis microbiológicos se realiza de acuerdo con las directrices dadas en el procedimiento respectivo PROC – TC – 002 Procedimiento de estimación de incertidumbres.

Una vez que se ha realizado el montaje y estandarización de una metodología analítica en el laboratorio, se lleva a cabo el proceso de validación o verificación, la cual involucra los siguientes pasos:


	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

4.7. Establecimiento del plan de validación o verificación

Dependiendo de las características del método de ensayo a desafiar, debe establecerse un plan que asegure la correcta y exitosa implementación del ejercicio. Este plan debe elaborarse teniendo en cuenta el alcance, atributos y procedimientos para ejecutar la validación o verificación establecidos en este documento. En el caso en el cual los documentos normativos del ensayo establezcan directrices diferentes, deberán seguirse los lineamientos en dichas referencias.

el plan se registra en el formato FOR-TC-013 Plan de validación o verificación de métodos analíticos. En dicho documento deben documentarse los siguientes aspectos:

- **Tipo de ejercicio:** Describir si se trata de un ejercicio de validación o verificación.
- **Método de ensayo sometido a evaluación:** Describir el código del procedimiento, versión y nombre del procedimiento.
- **Alcance del ejercicio:** Debe describirse detalladamente todos los aspectos que pretenden abordarse en el ejercicio. Esto incluye, pero no se limita a los analitos, matrices, intervalo de concentraciones, interferencias, modificaciones al procedimiento, uso de equipos, reactivos y/o otras condiciones que afecten el desempeño del método.
- **Criterios de aceptación para los atributos evaluados:** Deben detallarse los criterios de aceptación siguiendo los lineamientos establecidos en el numeral 4.8.
- **Diseño experimental:** Debe describirse minuciosamente el Grupo de blancos, muestras, adiciones, estándares de calibración o verificación, materiales de referencia, controles de calidad analítica que se emplearán en la evaluación del desempeño del método analítico. Esto también el número de veces que se ensayará cada ítem de ensayo, los intervalos de tiempo en los cuales se analizarán y las condiciones que se modificarán durante el ejercicio, con el propósito de desafiar apropiadamente el método, tales como equipos, analistas, condiciones ambientales, etc. En esta sección también se debe detallar el procedimiento de preparación de materiales de referencia, estándares de verificación, adiciones y otros ítems incluidos en el diseño experimental, cuya preparación sea específica para llevar a cabo el ejercicio de validación o verificación y por tanto no se describen en el procedimiento interno del método de ensayo
- **Equipos empelados en el ejercicio:** Debe listarse los equipos que se utilizarán en el ejercicio, incluyendo su identificación única y el estado de funcionamiento y calibración cuando aplique. la información puede obtenerse a partir del registro de horas de uso de los equipos, los registros de comprobaciones intermedias y los certificados de calibración. Estos documentos se encuentran en el módulo de equipos de la plataforma Analítica o en la carpeta de registros ubicada en el servidor de datos del laboratorio.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

- **Reactivos:** En el plan de validación o verificación deben listarse describiendo lo más completamente posible los reactivos que se utilizarán para la ejecución de los ensayos (esto incluye kits de ensayo en los casos en los cuales se empleen), la preparación de patrones, controles de calidad, los reactivos necesarios para la preparación de adiciones, las muestras retenidas y materiales de referencia que se emplearán. El alcance de la descripción de los reactivos debe comprender aspectos tales como la pureza, cantidad mínima con la cual debe contar el laboratorio y en los casos en los cuales el procedimiento interno así lo especifique, la marca y referencia del reactivo.
- **Materiales para utilizar:** Debe listarse detalladamente los materiales de laboratorio, incluyendo datos como capacidad, tamaño, material del cual están hechos y la cantidad requerida de cada uno de ellos. La disponibilidad de los materiales debe verificarse antes de iniciar el ejercicio de validación o verificación.

Además de lo anterior, en el plan debe establecerse la fecha límite para la realización del ejercicio y debe contar con la firma de los analistas que participarán, como evidencia de que conocen y comprenden el contenido del documento.

4.8. Especificación de los requisitos del método a validar.


Deben seleccionarse criterios de evaluación para todos y cada uno de los atributos analíticos evaluados durante el ejercicio de validación o verificación. Estos son definidos por el Laboratorio, teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- Los datos de desempeño proporcionados en las referencias bibliográficas de los métodos analíticos
- Las necesidades o requisitos establecidos por los clientes que requieren el ensayo.
- La legislación legal vigente (nacional e internacional)
- Los requisitos definidos en normas de fabricación o uso de materias primas y productos terminados.

Como se expresó en el numeral 4.7, estos requisitos deben documentarse en el plan de validación y la comparación de los resultados obtenidos durante el ejercicio de validación o verificación, con dichos requisitos debe documentarse y analizarse en el respectivo informe de validación. (ver más adelante).

4.9. Manejo de riesgos.


Durante la planificación del ejercicio, La Dirección Técnica, el Líder de Laboratorio y/o el analista a cargo, deben identificar, registrar e implementar un plan de manejo para los riesgos asociados al desarrollo del ejercicio, siguiendo los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-GC-009 Procedimiento para la identificación de riesgos. Esto debe documentarse en el correspondiente plan de validación

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

4.10. Informe de validación o verificación.

La validación del método es reportada en un Informe de Validación, que incluye:

- **Tipo de ejercicio:** Describir si se trata de un ejercicio de validación o verificación.
- **Método de ensayo sometido a evaluación:** Describir el código del procedimiento, versión y nombre del procedimiento.
- **Alcance del ejercicio:** Debe describirse detalladamente todos los aspectos que pretenden abordarse en el ejercicio. Esto incluye, pero no se limita a los analitos, matrices, intervalo de concentraciones, interferencias, modificaciones al procedimiento, uso de equipos, reactivos y/o otras condiciones que afecten el desempeño del método.
- **Criterios de aceptación para los atributos evaluados:** Deben detallarse los criterios de aceptación siguiendo los lineamientos establecidos en el numeral 4.8.
- **Diseño experimental:** Debe hacer referencia al diseño experimental planteado en el plan de validación o verificación correspondiente al ejercicio realizado.
- **Equipos empelados en el ejercicio:** Deben documentarse los equipos utilizados en el ejercicio, tal como se definió en el numeral 4.7. en el caso en el cual se haya empleado un equipo diferente o adicional durante el ejercicio, esta lista debe actualizarse en el informe.
- **Reactivos:** El informe debe contener la lista de reactivos utilizados en el ejercicio, tal como se definió en el numeral 4.7. en el caso en el cual se haya empleado un reactivo diferente o adicional durante el ejercicio, esta lista debe actualizarse en el informe.
- **Materiales utilizados:** Debe listarse detalladamente los materiales de laboratorio, tal como se definió en el numeral 4.7. en el caso en el cual se haya empleado material adicional durante el ejercicio, esta lista debe actualizarse en el informe.
- **Resultados obtenidos:** El informe debe contener los resultados obtenidos de la aplicación del método de ensayo sobre los ítems ensayados en el ejercicio. Así mismo, debe mostrar los resultados de la evaluación de todos y cada uno de los atributos definidos en el plan de validación, de acuerdo con las directrices establecidas en el numeral 4.11. El informe debe contener o hacer referencia a los registros de datos primarios derivados del ejercicio y a los cálculos realizados para estimar los resultados de las mediciones y para la estimación de los atributos del método analítico.
- **Declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto:** Debe emitirse de acuerdo con lo establecido en el numeral 4.12.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Los informes de validación o verificación se documentan empleando el formato FOR-TC-047.

4.11. Verificación de cumplimiento de parámetros o características de validación.

La verificación de cumplimiento de los parámetros o características de los métodos validados es realizada a través de una tabla comparativa entre los valores de los requisitos a cumplir (esperados del método) y los valores obtenidos por la aplicación del método. No sobra aclarar, que, para realizar una comparación correcta de los resultados obtenidos con los criterios establecidos en el plan, debe emplearse la misma fórmula de cálculo para el estimador mediante el cual se evalúa cada atributo y estar expresados en las mismas unidades.

Además de lo anterior, debe realizarse una corta discusión, análisis o interpretación de los resultados obtenidos y emitirse una declaración sobre la conformidad del resultado con sus respectivos criterios de aceptación.

4.12. Conclusiones de la validación.


La dirección Técnica debe emitir como conclusión una declaración sobre la aptitud del método de ensayo para el uso previsto por el laboratorio. Esta afirmación puede:

- Declarar el método como apto para el uso previsto
- Establecer el método como NO apto para el uso previsto
- Definir el método como parcialmente apto para su uso. En este último caso, debe realizarse una descripción exacta de las limitaciones de uso y el alcance para el cual es posible su utilización.

4.13. Revalidación o reverificación de los métodos de ensayo.

Para asegurar el correcto desempeño de los métodos de ensayo, estos deben evaluarse en intervalos de tiempo establecidos. Esto es necesario para tener la seguridad de que los cambios, en el ensayo o en el ambiente en que transcurre éste, sean o no intencionales, no alteran los atributos del método. La periodicidad para el seguimiento del desempeño debe definirse, teniendo en cuenta:

- Los criterios establecidos en los métodos de referencia.
- Los cambios que ha sufrido el método (cambio de analista, equipos, patrones, locación, etc.).
- Los resultados de desempeño del método en el control de calidad analítico de rutina.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

- El tiempo transcurrido desde el último ejercicio de evaluación del método
- La inclusión de matrices dentro del alcance de aplicación del ensayo

Con el propósito de mantener un adecuado control sobre los periodos en los cuales deben repetirse los diferentes ejercicios de evaluación, la dirección Técnica implementa un cronograma de validaciones o verificaciones de los métodos de ensayo, el cual se registra en el formato FOR-TC-116 Formato para la planificación de actividades de verificación de métodos. Este cronograma se actualiza de acuerdo con la ejecución de las actividades planeadas, según las necesidades de reevaluaciones a los métodos analíticos en producción o la implementación de nuevos ensayos.

5. RESPONSABILIDADES.

5.1. Director de Calidad.

Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

5.2. Director Técnico.

Asegurar la aplicación del presente documento, apoyar el diseño de los planes de validación y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

5.3. Director de Validaciones.

Gestionar la adquisición de los insumos necesarios para desarrollar los ensayos de validación o verificación de métodos.

Asegurar la correcta ejecución de los planes de validación o verificación de métodos
 Revisar los planes e informes de validación o verificación y someterlos a aprobación por parte de la dirección técnica

5.4. Líder de Laboratorio.

Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.


5.5. Analistas.

Aplicar el presente documento.

6. DOCUMENTOS RELACIONADOS.

FOR-TC-013 Formato de plan de validación de métodos analíticos.


FOR-TC-047 Informe de validación o verificación de métodos analíticos

	<p>Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos</p> <p>AOXLAB S.A.S.</p>	<p>Identificación: PROC-TC-012</p>
		<p>Revisión: 9</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2024-09-02</p>

FOR-TC-116 Formato para la planificación de actividades de verificación de métodos

SOFT-TC-078 Herramienta validación ensayos microbiológicos para la industria de alimentos

SOFT-TC-079 Herramienta validación métodos FQ

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

7. ANEXOS.

ANEXO N° 1: Clasificación de categorías (de alimentos) Y combinaciones objetivo sugerido para estudios de verificación

La Tabla siguiente describe la clasificación de alimentos, piensos, producción primaria y muestras ambientales para guiar a los laboratorios en la selección de ítems (alimentos) en sus categorías correspondientes (alimentos) al realizar la verificación del método.

Las propiedades intrínsecas de los alimentos, como los niveles de microbiota autóctona, el contenido de grasa, el pH, el contenido de sal, la actividad del agua y la presencia de compuestos antimicrobianos, pueden tener una influencia sustancial en el resultado de un método. Las principales propiedades fisicoquímicas de los alimentos se han tenido en cuenta en la medida de lo posible en la clasificación de los alimentos.

Puntos para tener en cuenta al utilizar la Tabla:

- El símbolo "Y" en la Tabla indica que, para esa muestra, es relevante realizar una prueba del microorganismo indicado.
- IMF es la abreviatura de "alimentos con humedad intermedia" (Por sus siglas en inglés "intermediate moisture food")

aoxlab	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Categorías	Tipos	items (ejemplos)	Total viable count	Bacterias ácido-lácticas	Mohos y levaduras	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i>	Staphylocooco Coagulasa positiva	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Listeria spp.</i>	<i>L.mono cytogenes</i>	Shigatoxin-producing E. coli (STEC)	<i>Cronobacter spp.</i>	<i>Campylobacter</i>	(Patogénica) <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Bacillus cereus (Células vegetativas y esporas)</i>	<i>Clostridium perfringens (Células vegetativas y esporas)</i>	<i>Clostridium botulinum (Células vegetativas y esporas)</i>
Leche cruda y productos lácteos	Leches crudas y/o leches fermentadas / acidificadas (no tratadas térmicamente)	Leche cruda	Y				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y				
		Yogures de leche cruda fermentados / acidificados crudos, bebidas crudas a base de lácteos					Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y				
	Productos a base de leche cruda, con alto contenido de grasa y / o microbiota de fondo	Mantequillas crudas					Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y				
		Cremas crudas					Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y				
		Quesos duros y semiduros (por ejemplo, Comté, Beaufort)					Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y				
		Quesos azules (Roquefort)					Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y				
		Quesos blandos (por ejemplo, Brie, Munster)					Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y				


aoxlab	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos	Identificación: PROC-TC-012
	AOXLAB S.A.S.	Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Categorías	Tipos	Ítems (ejemplos)	Total viable count	Bacterias ácido-lácticas	Mohos y levaduras	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococcus Coagulasa positiva	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogenes	Shigatoxina-producing E. coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Patogénica) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (Células vegetativas y esporas)	Clostridium perfringens (Células vegetativas y esporas)	Clostridium botulinum (Células vegetativas y esporas)	
y productos lácteos procesados térmicamente	Productos lácteos pasteurizados	Postres a base de leche, helados, bebidas, cremas	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y			
	Productos lácteos esterilizados o UHT	Leches UHT, leches enlatadas o cremas															Y			
	Productos a base de leche pasteurizados	Leche pasteurizada fermentada / acidificada, yogures, productos lácteos				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
		Leches pasteurizadas		Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
		Mantequillas				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y								
		Cremas				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y								
		Quesos duros y semiduros (procesados térmicamente) (por ejemplo, Comté, Emmental, Gouda)				Y			Y	Y	Y	Y								
		Quesos azules (Bleu de Bresse)						Y	Y	Y	Y	Y								
		Quesos blandos (por ejemplo, Brie, Munster)							Y	Y	Y	Y								Y
	Seco	Leche en polvo		Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
		Polvo para postres a base de leche		Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		

Categorías	Tipos	Ítems (ejemplos)	Total viable count	Bacterias ácido-lácticas	Mohos y levaduras	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococo Coagulasa positiva	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. mono cytogenes	Shigatoxin-producing E. coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (Células vegetativas y esporas)	Clostridium perfringens (Células vegetativas y esporas)	Clostridium botulinum (Células vegetativas y esporas)
Carne cruda y productos cárnicos listos para cocinar (excepto aves)	Carnes frescas (sin procesar)	Canales, cortes de carne, carpacho	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y				
		Carne picada, preparaciones de carne, carpacho	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y				
		Canales, hisopos, enjuagues	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y				
	Listo para cocinar (procesado)	Hamburguesas congeladas, brochetas de ternera marinadas	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y				
Productos cárnicos listos para comer, listos para calentar	Productos cárnicos cocidos	Jamón cocido, paté	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y
	Productos cárnicos fermentados o secos	Salami	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y
		Curado crudo (ahumado) (aw > 0,92]	Filete ahumado, manteca de cerdo	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y
		Curado crudo (ahumado) (aw < 0,92]	Jamón de Cobourg, jamón curado en seco	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						
	Carne enlatada (estable a temperatura ambiente)	Carne de vaca														Y	Y	Y	

aoxlab	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Categorías	Tipos	Ítems (ejemplos)	Total viable count	Bacterias ácido-lácticas	Mohos y levaduras	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococcus Coagulasa positiva	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. mono cytogenes	Shigatoxin-producing E. coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (Células vegetativas y esporas)	Clostridium perfringens (Células vegetativas y esporas)	Clostridium botulinum (Células vegetativas y esporas)
Aves de corral crudas y productos de aves de corral listos para cocinar	Carnes frescas (sin procesar)	Canales, carnes, cortes	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y					
		Canales, hisopos, enjuagues	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y					
		Carne picada, preparaciones de carne	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y					
	Productos listos para cocinar [procesados]	Pechugas de pollo sazonadas	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y					
Productos cárnicos de aves de corral listos para consumir y calentar	Productos cárnicos cocidos	Filete de pavo cocido	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y			Y	Y	Y
	Productos cárnicos fermentados o secos	Salchicha de pollo	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y			Y	Y	Y
	Curado crudo (ahumado) Aw > 0,92]	Filete de pavo ahumado	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y			Y	Y	Y
	Enlatado (estable al ambiente)	Carne de ave en conserva, paté de pato en conserva															Y	Y	Y
Huevos y productos de huevo (derivados)	Huevos (no procesados)	Huevos con cáscara	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y					
	Productos de huevo (procesados térmicamente) con aditivos (sal o azúcar > 2%)	Yema de huevo, clara de huevo, huevo líquido entero	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y	Y	Y
	Productos de huevo (procesado térmicamente) sin aditivos	Yema de huevo, clara de huevo, huevo líquido entero	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y	Y	Y
	Seco	Huevo en polvo	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y	Y	Y

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos	Identificación: PROC-TC-012
	AOXLAB S.A.S.	Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Categorías	Tipos	Ítems (ejemplos)	Total viable count	Mohos y levaduras	Bacterias ácido-lácticas	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Coagulasa positiva	Staphylo coccu	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. mono cytogenes	Shigatoxin-producing E. coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (Células vegetativas y esporas)	Clostridium perfringens (Células vegetativas y esporas)	Clostridium botulinum (Células vegetativas y esporas)
Pescados y mariscos crudos y listos para cocinar (sin procesar)	Pescado (sin procesar)	Pescado	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y				Y	Y				
	Mariscos (sin procesar)	Ostra, almeja, vieira, mejillón	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y				Y	Y				
	Crustáceos (sin procesar)	Camarones, cangrejo y carne de cangrejo, langosta	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y				Y	Y				
	Pescados y mariscos listos para cocinar [procesados]	Palitos de pescado congelados														Y	Y			
Productos pesqueros listos para consumir, listos para recalentar	Productos pesqueros cocidos	Productos descascarados y desconchados de crustáceos cocidos, pescado y terrinas de marisco	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y					Y	Y	Y	Y
	Productos de la pesca acidificados y marinados	Rollo de arenque, anchoa	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
	Ahumados o curados y otros productos elaborados (° aw> 0,92]	Pescado ahumado	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y					Y	Y		Y
	Ahumados o curados y otros productos elaborados (a w <0,92]	Pescado ahumado, pescado seco (salado)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y					Y	Y		
	En lata (pescado estable al ambiente)	Pescado enlatado, cangrejo enlatado																Y	Y	Y

aoxlab	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos	Identificación: PROC-TC-012
	AOXLAB S.A.S.	Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Categorías	Tipos	Ítems (ejemplos)	Total viable count	Bacterias ácido-lácticas	Mohos y levaduras	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococcus Coagulasa positiva	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. mono cytogenes	Shigatoxin-producing E. coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (Células vegetativas y esporas)	Clostridium perfringens (Células vegetativas y esporas)	Clostridium botulinum (Células vegetativas y esporas)
Frutas y productos frescos	Frutas cortadas listas para comer	Mezcla de frutas	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			
	Vegetales cortados listos para comer	Verduras de hoja precortadas en bolsas, ensaladas, zanahoria rallada	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			
	Productos cultivados en o en contacto con el suelo	Patatas, ñame, batatas, mandioca, dalia, zanahorias, verduras crucíferas					Y		Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y			
	Coles	Soja, fenogreco, alfalfa, semilla de mungo	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y			
	Jugos de frutas / vegetales crudos (sin pasteurizar)	Zumo de fresa recién exprimido, batidos, zumo de zanahoria	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y			Y
	Verduras de hoja verde	Albahaca, cilantro, cebolleta, lechuga y perejil				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y			
	Hortalizas y frutas (sin procesar) no descritas anteriormente	Cultivos				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y			

aoxlab	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos	Identificación: PROC-TC-012
	AOXLAB S.A.S.	Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Categorías	Tipos	Ítems (ejemplos)	Total viable count	Bacterias ácido-lácticas	Mohos y levaduras	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococcus Coagulasa positiva	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. mono cytogenes	Shigatoxin-producing E. coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (Células vegetativas y esporas)	Clostridium perfringens (Células vegetativas y esporas)	Clostridium botulinum (Células vegetativas y esporas)
Frutas y vegetales procesados	Jugos de frutas / verduras procesados térmicamente	Jugo de manzana pasteurizado	Y						Y	Y	Y					Y	Y	Y	
	Frutas y verduras enlatadas (estables al ambiente)	Piñas enlatadas														Y	Y	Y	
	Verduras y frutas procesadas térmicamente	Espinaca blanqueada, verduras congeladas blanqueadas	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y					Y	Y	Y	
	Verduras fermentadas / acidificadas	Repollo fermentado, encurtido	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y					Y	Y	Y	
Cereales secos, frutas, frutos secos, semillas y hortalizas.	Low and IMF fruits [A _w < 0,85)	Siropes, concentrados, mermeladas, ciruelas pasas semisecas	Y		Y			Y	Y							Y			
	Condimentos	Espicias, hierbas, pimientos	Y		Y			Y	Y							Y			
	Nueces y semillas	Frutos secos, carnes de frutos secos, mantequillas de frutos secos, semillas	Y		Y			Y	Y	Y	Y					Y			
	Frutas y hortalizas secas [a _w <0,60)	Verduras liofilizadas	Y		Y				Y	Y	Y					Y			
	Cereales secos	Maíz, avena, cereales para el desayuno	Y		Y				Y	Y	Y					Y			
	Harinas	Trigo, semillas de alforfón, avena	Y		Y				Y	Y	Y					Y			

aoxlab	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos	Identificación: PROC-TC-012
	AOXLAB S.A.S.	Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Categorías	Tipos	Ítems (ejemplos)	Total viable count	Bacterias ácido-lácticas	Mohos y levaduras	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococo Coagulasa positiva	Salmonella spp.	Listeria spp.	L.mono cytogenes	Shigatoxin-producing E. coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (Células vegetativas y esporas)	Clostridium perfringens (Células vegetativas y esporas)	Clostridium botulinum (Células vegetativas y esporas)
Fórmula para lactantes y cereales para lactantes	Ingredientes probióticos	Polvos de cultivo premezclados, secados por aspersión	Y			Y	Y	Y	Y				Y				Y	Y	
	Ingredientes no probióticos	Leche deshidratada, yogur deshidratado, frutos rojos deshidratados	Y			Y	Y	Y	Y				Y				Y	Y	
	Fórmula infantil no probiótica	Formulación de fortificación a base de suero (lácteos), a base de soja (verduras)	Y			Y	Y	Y	Y				Y				Y	Y	
	Fórmula infantil probiótica	Formulación de fortificación a base de suero (lácteos), a base de soja (verduras)	Y			Y	Y	Y	Y				Y				Y	Y	
	Cereales infantiles no probióticos	Cereales para lactantes	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y	Y	
	Cereales infantiles probióticos	Cereales probióticos para bebés	Y		Y	Y		Y	Y								Y		

aoxlab	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos	Identificación: PROC-TC-012
	AOXLAB S.A.S.	Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Categorías	Tipos	Ítems (ejemplos)	Total viable count	Bacterias ácido-lácticas	Mohos y levaduras	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Coagulasa positiva	Staphylo coccio	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. mono cytogenes	Shigatoxin-producing E. coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (Células vegetativas y esporas)	Clostridium perfringens (Células vegetativas y esporas)	Clostridium botulinum (Células vegetativas y esporas)
			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Chocolate, productos de panadería y repostería	Pasteles	Productos de panadería con natillas, repostería	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y		
	Polvo seco	Mezclas para pasteles	Y		Y			Y	Y	Y	Y	Y						Y		
	Baja humedad	Galletas, panes	Y		Y			Y	Y	Y	Y							Y		
	Seco y azucarado de baja humedad K <0,85)	Pastel, bombones, mazapán	Y		Y			Y	Y	Y	Y							Y		
	Seco y azucarado de baja humedad [aW <0,65)	Galletas, chocolate, confitería, miel, azúcar, jarabes de caramelo	Y		Y			Y	Y	Y	Y							Y		
Alimentos multicomponentes o componentes de comidas	Alimentos compuestos con una gran cantidad de ingredientes crudos (excluida la pastelería)	Ensaladas de pasta refrigeradas, sándwiches, mousse de chocolate, crema bávara	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y	Y	Y
	Alimentos compuestos procesados (cocidos)	Comidas calientes	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y			Y	Y	Y
	Alimentos listos para recalentar: refrigerados	Alimentos cocidos refrigerados, arroz o pasta hervidos, volcán de hojaldre	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y			Y	Y	Y

aoxlab	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02


Categorías	Tipos	Items (ejemplos)	Total viable count	Bacterias ácido-lácticas	Mohos y levaduras	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococo Coagulasa positiva	Salmonella spp.	Listeria spp.	L.mono cytogenes	Shigatoxin-producing E. coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (Células vegetativas y esporas)	Clostridium perfringens (Células vegetativas y esporas)	Clostridium botulinum (Células vegetativas y esporas)
Alimentos multicomponentes o componentes de comidas	Alimentos listos para recalentar: congelados	Papas fritas congeladas, pizza, croissants rellenos	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y						Y	Y	Y
	Listos para - recalentar alimentos: estables al ambiente (enlatados)	volcán de hojaldre en botellas de vidrio															Y	Y	Y
	Alimentos listos para recalentar: secos	Sopas deshidratadas (instantáneas)	Y						Y	Y	Y						Y	Y	Y
	Ensaladas de delicatessen a base de mayonesa (ácidas) con ingredientes	Ensaladas de verduras crudas con aderezo	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y				Y		Y
	Ensaladas de delicatessen a base de mayonesa (ácidas) con ingredientes procesados	Crema de untar para Sándwich	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y					Y		Y
	Alimentos ácidos ambientalmente estables (pH <4,8)	salsa de tomate, salsas, aderezos, mayonesas, mostaza	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y					Y		Y

aoxlab	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos	Identificación: PROC-TC-012
	AOXLAB S.A.S.	Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Categorías	Tipos	Ítems (ejemplos)	Total viable count	Bacterias ácido-lácticas	Mohos y levaduras	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylococcus Coagulasa positiva	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. mono cytogenes	Cronobacter spp.	Shigatoxin-producing E. coli (STEC)	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (Células vegetativas y esporas)	Clostridium perfringens (Células vegetativas y esporas)	Clostridium botulinum (Células vegetativas y esporas)
Alimentos para mascotas y piensos para animales	Ingredientes de origen animal	Harina de carne y huesos, harina de pollo y plumas, harina de pescado, digestión animal	Y		Y	Y	Y	Y	Y						Y		Y		
	Ingredientes de origen vegetal	Harina de maíz, harina de soja, verduras	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
	Otros ingredientes	Productos microbianos como extractos de levadura y probióticos.	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
	Pienso (aw<0,7)	Pellets, golosinas	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
	Comida húmeda (aw> 0,7)	Carnes frescas, embutidos, croquetas.	Y		Y	Y	Y	Y	Y						Y		Y	Y	Y
	Enlatado	Carne, pescado															Y		
	Alimentos para animales (bovinos, ovinos, porcinos)	Cereales, harinas	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
	Alimentos para animales (aves de corral)	Cereales, harinas	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y		
Alimentos para animales (peces)	Cereales, harinas	Y		Y	Y	Y	Y	Y								Y			
Muestras ambientales (producción de alimentos o piensos)	Equipo o entorno de producción	Hisopos, polvos	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y
	Aguas utilizadas en el proceso de fabricación	Agua de lavado reciclada, agua de proceso	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y

aoxlab	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos	Identificación: PROC-TC-012
	AOXLAB S.A.S.	Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Categorías	Tipos	Items (ejemplos)	Total viable count	Bacterias ácido-lácticas	Mohos y levaduras	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Staphylo coccu Coagulasa positiva	Salmonella spp.	Listeria spp.	L.mono cytogenes	Shigatoxin-producing E. coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (Células vegetativas y esporas)	Clostridium perfringens (Células vegetativas y esporas)	Clostridium botulinum (Células vegetativas y esporas)
Muestras de producción primaria (PPS)	Heces de animales	Muestras de hisopos (calcetines de botas), heces rectales							Y			Y	Y	Y	Y				
	Muestras ambientales y no fecales	Muestras de polvo, hisopos de higiene, agua de bebederos, basura, muestras de criadero							Y			Y	Y	Y	Y				

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

NOTA 1 Si es relevante, algunas categorías o elementos se pueden recopilar o dividir.

NOTA 2 Algunos organismos reguladores tienen requisitos específicos para obtener una aprobación.

NOTA 3 Los productos sin transformar, de acuerdo con el REGLAMENTO (CE) No 852/2004, se describen como “productos alimenticios que no han sido procesados e incluyen productos que han sido divididos, partidos, cortados, rebanados, deshuesados, picados, pelados, molidos, cortado, limpiado, recortado, descascarillado, molido, refrigerado, congelado, ultracongelado o descongelado. Esto no incluye los procesos de saneamiento permitidos por determinadas jurisdicciones. Por lo tanto, se necesita una distinción entre productos crudos no presentados y productos sometidos a procesos de saneamiento. Diferentes jurisdicciones tienen diferentes definiciones para productos procesados y no procesados. Es importante consultar con la autoridad correspondiente en la jurisdicción. EJEMPLO Carne fresca [ver REGLAMENTO (CE) No 853/2004] significa carne que no ha sido sometida a ningún proceso de conservación que no sea enfriar, congelar o congelar rápidamente, incluida la carne envuelta al vacío o envuelta en atmósfera controlada.

NOTA 4 El procesamiento de acuerdo con el REGLAMENTO (CE) No 852/2004 se describe como “cualquier acción que altere sustancialmente el producto inicial, incluido el calentamiento, ahumado, curado, maduración, secado, marinado, extracción, extrusión o una combinación de los mismos procesos”. Los productos procesados pueden contener ingredientes necesarios para su fabricación o para darles características específicas. Diferentes jurisdicciones tienen diferentes definiciones para productos procesados y no procesados. Es importante consultar con la autoridad correspondiente en la jurisdicción.

NOTA 5 Las preparaciones de carne picada incluyen carne en porciones, cortada o picada (<1% de NaCl o especias) destinada a someterse a un tratamiento térmico antes del consumo, y presentada como sazonada, marinada, recubierta o con hierbas y especias u otros ingredientes que se agregan a mejorar las propiedades sensoriales o la textura.


NOTA 6 Las preparaciones de carne de ave incluyen cortes de carne marinados y condimentados, filetes de pollo y alitas de pollo, es decir, una estructura intacta con o sin piel.

NOTA 7 Los mariscos incluyen moluscos bivalvos vivos y, por analogía, gasterópodos marinos, equinodermos y tunicados.

NOTA 8 Los alimentos listos para el consumo (RTE) son alimentos destinados por el productor o el fabricante para consumo humano directo. consumo sin necesidad de cocción u otro procesamiento eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos de interés.

NOTA 9 Los alimentos listos para cocinar (RTC) son alimentos diseñados por el productor o el fabricante como alimentos que requieren cocción u otro procesamiento eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos de interés.

NOTA 10 Los alimentos listos para recalentar (RTRH) son alimentos diseñados por el productor o el fabricante como aptos para el consumo humano directo sin necesidad de

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

cocción, pero que pueden beneficiarse de la calidad organoléptica de un poco de calentamiento antes del consumo.


NOTA 11 Para las definiciones de pienso, consulte el REGLAMENTO (CE) No 79/373 / CEE .

NOTA 12 El agua mencionada en la Tabla es agua utilizada en el proceso de fabricación o para PPS. En estos casos, no es necesaria la filtración de muestras.

NOTA 13 Si se van a analizar tamaños de muestra específicos de un artículo considerado en una categoría de alimentos, p. Ej. 375 g de carne molida, se prueba un protocolo técnico completo en el estudio de comparación de métodos para este caso específico.

NOTA 14 Cuando se va a validar un método para fórmulas para lactantes y / o cereales para lactantes que contienen probióticos, los elementos que contienen probióticos se seleccionan y validan como una categoría completa.

NOTA 15 Si el estudio se dirige a los formadores de esporas, se incluyen tanto las células vegetativas como las esporas.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Anexo N°. 2 orientación sobre cómo elegir los ítems (alimentos) desafiantes para la verificación de los ítems (alimentos)

Generalidades

Es importante seleccionar ítems (alimentos) que sean representativos de los que se ensayan rutinariamente en el laboratorio. Este anexo se aplica específicamente a la verificación de ítems (alimentos). El ítem (alimento) puede afectar el resultado de un análisis. La composición de la comida, la microbiota natural y otros contaminantes pueden interferir con el método de ensayo e invalidar el resultado. Por lo tanto, el laboratorio debe asegurarse de que el método sea adecuado para el propósito del (alimento) ítems de su interés. Incluso si un método está validado para una amplia gama de alimentos, no todos los ítems (alimentos) se han ensayado durante la validación. Por lo tanto, es importante que el laboratorio demuestre que el método es aplicable a los ítems (alimentos) analizados en el laboratorio. Como solo se requiere un ítem (alimento) de cada categoría (alimento), es importante realizar la verificación del ítem (alimento) con el más desafiante.

Efectos matriz para tener en cuenta

Características microbiológicas


A menos que el alimento haya sido esterilizado (por ejemplo, alimentos enlatados), los ítems (alimentos) pueden contener microorganismos (introducidos de forma natural o intencional en el proceso de fabricación), que se pueden clasificar como:

- Microbiota tecnológica como cultivos microbianos y probióticos, por ejemplo, alimentos fermentados y curados, productos alimenticios probióticos inoculados con un nivel de microorganismos de 10⁶ UFC/g a 10⁹ UFC/g.
- Muestras de microbiota de fondo elevado, por ejemplo, carne picada de aves de corral, muestras fecales, leche cruda.
- Microorganismos de descomposición: la presencia de esta microbiota nativa puede influir en la recuperación y el crecimiento del microorganismo objetivo.

Propiedades fisicoquímicas

Se sabe que los siguientes parámetros físicos y químicos afectan la recuperación de microorganismos y / o el rendimiento del método:

- Composición, por ejemplo, alto contenido de grasa, lecitina, espesante, contenido de nutrientes, etc.
- pH, por ejemplo, pH menor de 4 a 5 (por ejemplo, bebidas, salsas, etc.)
- Potencial de oxidorreducción.
- Actividad del agua, por ejemplo, a_w menor de 0,85 (harina, alimentos con bajo contenido de humedad, etc.)
- Componentes antimicrobianos e inhibidores del crecimiento, por ejemplo, polifenoles, enzimas, inhibidores moleculares.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

- Estructura física del alimento, por ejemplo, viscosidad, solubilidad, etc.
- Color, tintes alimentarios.

Características inducidas por el procesamiento de alimentos

El proceso de fabricación, la matriz a menudo puede tener un proceso de tratamiento (por ejemplo, calentamiento, proceso de alta presión, etc.) que podría resultar en el daño de las células microbianas. Esto afecta la viabilidad y la capacidad de cultivo de las células y, por lo tanto, afecta la recuperación del microorganismo en cuestión.

Selección de ítems (alimentos) para verificación


Las características microbianas, físicas, químicas e inducidas por procesos mencionadas anteriormente se pueden encontrar en los ítems (alimentos) en todas las categorías (de alimentos) descritas en el Anexo N°1.

Al seleccionar un ítem (alimento) desafiante de cada categoría, el laboratorio debe elegir, entre los ítems (alimentos) analizados en su laboratorio, aquellos que muestren una o más de las características desafiantes. Por ejemplo, es preferible un ítem (alimento) que tenga una combinación de dos características desafiantes (por ejemplo, pH + aw), ya que representa el peor de los casos.

Para una amplia gama de alimentos, se requiere un mínimo de cinco alimentos seleccionados de cinco categorías de alimentos. Cuando sea posible, cada uno de los cinco alimentos deberá tener una característica desafiante diferente o una combinación de estas características para cubrir diferentes casos. La siguiente proporciona un ejemplo.

Categoría	Ítem	Característica desafiante
1	1	pH
2	2	Viscosidad
3	3	Contenido de grasa
4	4	Contenido de microbiota natural y pH
5	5	Polifenoles

La selección de ítems (alimentos) también depende del principio del método lo cual puede ser útil al laboratorio en la selección de éstos. La Tabla siguiente da ejemplos de características de los alimentos que, según el principio del método, pueden afectar el desempeño de este.

	Procedimiento de validación o verificación de métodos analíticos AOXLAB S.A.S.	Identificación: PROC-TC-012
		Revisión: 9
		Inicio de vigencia: 2024-09-02

Principio del método	Alto número de microorganismos competitivos		Características físicas				Compuesto químico			
	Microbiota tecnológica	Alto contenido de microbiota natural y deterioro	pH	aw	Solubilidad/viscosidad	Color	Vainillina, sal	Enzimas	Polifenoles	Inhibidor molecular
Método de cultivo	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Inmuno-enzimático	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Ensayo molecular	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Citometría de flujo	x	x	x	x	x	x	x			
ATP	x	x	x	x	x	x	x			