

## Servicio de Acreditación Ecuatoriano



**CR EA01**

Criterios Específicos

R03

2022-01-27

**ACREDITACIÓN DE  
LABORATORIOS QUE  
REALIZAN ENSAYOS  
MICROBIOLÓGICOS**

El presente documento se distribuye como copia no controlada.  
Su revisión vigente debe ser consultada en la página web:  
[www.acreditacion.gob.ec](http://www.acreditacion.gob.ec)

|   |  |  |
|---|--|--|
| <b>Elaborado por:</b><br>DAL<br><br>W. Pérez<br>Fecha: 2022-01-27 | <b>Revisado por:</b><br>DGC<br>CGT<br><br>C. Plaza<br>M. Romo<br>Fecha: 2022-01-27 | <b>Aprobado por:</b><br>DE<br><br>M. Romo (S)<br>Fecha: 2022-01-27 |
|---|--|--|

## ÍNDICE

|      |   |    |
|------|---|----|
| 1.   | OBJETO .....  | 3  |
| 2.   | ALCANCE .....   | 3  |
| 3.   | DOCUMENTOS DE REFERENCIA .....  | 3  |
| 4.   | DEFINICIONES .....  | 5  |
| 5.   | RESPONSABILIDADES Comité Técnico:.....  | 8  |
| 6.   | DESCRIPCIÓN.....  | 9  |
| 6.2. | ESTRUCTURA DE LOS CRITERIOS A LA NORMA NTE INEN ISO/IEC 17025:2018.....   | 9  |
| 6.3. | DESARROLLO DE LOS CRITERIOS ESPECÍFICOS APLICABLES A LA NORMA NTE<br>INEN ISO/IEC 17025 PARA LABORATORIOS MICROBIOLÓGICOS ..... | 10 |
| 6.2  | Personal .....  | 10 |
| 6.3  | Instalaciones y condiciones ambientales .....   | 10 |
| 6.4  | Equipamiento .....  | 11 |
| 6.5  | Trazabilidad metrológica .....  | 12 |
| 6.6. | Productos y servicios suministrados externamente: Reactivos y medios de cultivo .....   | 12 |
| 7.2  | Selección, verificación y validación de métodos .....   | 13 |
| 7.4  | Manipulación de los ítems de ensayo o de calibración .....  | 16 |
| 7.5  | Registros .....   | 16 |
| 7.6  | Evaluación de la incertidumbre de medición.....   | 16 |
| 7.7  | Aseguramiento de la validez de los resultados .....   | 18 |
| 7.8  | Informe de los resultados .....   | 18 |
| 7.   | REGISTROS.....  | 18 |

## 1. OBJETO

El objetivo del presente documento es establecer los lineamientos específicos que deben cumplir los laboratorios acreditados o en proceso de acreditación que realizan ensayos microbiológicos, con el propósito de demostrar el cumplimiento de los requisitos de la Norma NTE INEN ISO/IEC 17025 cuando incluyen ensayos microbiológicos dentro del alcance de acreditación mediante puntualizaciones relativas a este tipo de ensayos.

## 2. ALCANCE

El presente documento es aplicado por el SAE para la evaluación de Laboratorios que realizan ensayos microbiológicos, en sus instalaciones permanentes o in situ.

Los laboratorios de análisis microbiológicos que soliciten la acreditación deberán cumplir los requisitos generales establecidos en la norma NTE INEN ISO/IEC 17025:2018, "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración", y los criterios establecidos en el documento CR GA01 "Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según la norma NTE INEN ISO/IEC 17025", así como las directrices contenidas en el presente documento.

Se considera que los análisis microbiológicos incluyen pruebas de esterilidad, detección, aislamiento, recuento e identificación de microorganismos y sus metabolitos en diferentes materiales y productos, o cualquier tipo de ensayo en el que se utilicen microorganismos como parte de un sistema de detección, así como la utilización de microorganismos para ensayos ecológicos. De ahí se deduce que algunas de las directrices contenidas en el presente documento, como las referentes a la bioseguridad de los laboratorios, tendrán que ser interpretadas en consecuencia. Este documento sirve también para los laboratorios que utilizan técnicas en áreas relacionadas con la microbiología, como bioquímica, biología molecular y cultivos celulares, aunque esos laboratorios pueden tener que cumplir otros requisitos adicionales.

El presente documento trata sobre la calidad de los resultados de los ensayos, sin abordar específicamente aspectos relacionados con la salud y la seguridad. No obstante, los laboratorios deben cumplir las prácticas de la legislación nacional vigente en materia de salud, seguridad y medio ambiente, aplicables. Es importante recordar que, las cuestiones relacionadas con la salud y la seguridad pueden influir en la calidad de los ensayos. La actividad analítica a la que se dedica el laboratorio definirá el nivel de bioseguridad con que se debe trabajar.

La norma NTE INEN ISO/IEC 17025 sigue siendo el documento que prevalece y, en caso de conflicto constituirá la base para su resolución por parte del SAE.

## 3. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| NTE INEN ISO/IEC 17025:2018 | Requisitos generales para la competencia de los Laboratorios de ensayo y de calibración ( <b>ISO/IEC 17025:2017</b> , IDT)   |
| ISO/IEC 17011:2017          | Evaluación de la conformidad — Requisitos generales para los organismos de acreditación que realizan la acreditación de organismos de evaluación de la conformidad |
| ISO/IEC 17000:2020          | Evaluación de la Conformidad – Vocabulario y principios generales  |
| EURACHEM guide:2013         | Acreditation for Microbiological Laboratories, Second edition.   |

|  |  |
|--|--|
| CEA-ENAC-20 Rev. 1   | Mayo 2017 Serie 1. Criterios Específicos de Acreditación. Análisis microbiológico (ENAC).  |
| ISO 9000:2015  | Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario   |
| VIM (JCGM 200:2012)  | International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms. (3rd edition, 2008 version with minor corrections)  |
| GUM (JCGM 100:2008)  | Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM 1995 with minor corrections)   |
| UNE EN ISO 11133:2014  | Microbiología de los alimentos para consumo humano alimentación animal<br>Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo.   |
| ISO 16140 Microbiology of the food chain – Method validation. Series | ISO 16140-1:2016. Part 1: Vocabulary;<br>ISO 16140-2: 2016 Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method;<br>ISO 16140-3:2021 Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory;<br>ISO 16140-4:2020 Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory; ISO 16140-5:2020 Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods; ISO 16140-4:2019 Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures |
| ISO 7128:2007  | Microbiology of food and animal feeding stuffs- General requirements and guidance for microbiological examinations.  |
| ISO 19036: 2019  | Microbiology of the food chain-Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations   |
| UNE EN ISO 13843:2018  | Calidad del agua, Requisitos para el establecimiento de las características de desempeño de los métodos microbiológicos cuantitativos.   |
| ISO 29201: 2012  | Water quality- The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods.  |

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| ISO 3534-1:2006                | Statistics -- Vocabulary and symbols -- Part 1: General statistical terms and terms used in probability. |
| ST/NAR/26/Rev.1                | Glosario de términos sobre garantía de calidad y buenas prácticas de laboratorio. UNODC 2012             |
| Red PARF Documento Técnico. 11 | Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica. OMS 2013.                    |

#### 4. DEFINICIONES

Alcance de aplicación del laboratorio: Categorías, matrices, analitos y concentraciones para un método analítico que el laboratorio afirma ser capaz de evaluar satisfactoriamente en su laboratorio [ISO 16140-3:2021].

Alcance de validación: Categorías, matrices, analitos y concentraciones para los que un método de análisis validado puede ser usado satisfactoriamente [ISO 16140-3:2021].

**Calibración:** “Operación que bajo condiciones especificadas establece, en una primera etapa, una relación entre los valores y sus incertidumbres de medida asociadas obtenidas a partir de los patrones de medida, y las correspondientes indicaciones con sus incertidumbres asociadas y, en una segunda etapa, utiliza esta información para establecer una relación que permita obtener un resultado de medida a partir de una indicación.

*NOTA 1 Una calibración puede expresarse mediante una declaración, una función de calibración, un diagrama de calibración, una curva de calibración o una tabla de calibración. En algunos casos, puede consistir en una corrección aditiva o multiplicativa de la indicación con su incertidumbre correspondiente.*

*NOTA 2 Conviene no confundir la calibración con el ajuste de un sistema de medida, a menudo llamado incorrectamente “auto calibración”, ni con una verificación de la calibración.*

*NOTA 3 Frecuentemente se interpreta que únicamente la primera etapa de esta definición corresponde a la calibración”. [Vocabulario Internacional de Metrología].*

**Cepas de referencia:** Microorganismo obtenido directamente de una colección de cultivos de referencia y definido como mínimo a nivel de género y especie, catalogado y descrito conforme a sus características y preferiblemente procedente de productos alimenticios para consumo humano o animal, de un entorno de producción de alimentos para consumo humano o animal, o de agua según corresponda [UNE EN ISO 11133:2014].

*NOTA 1. Los nombres de los microorganismos deben ir en cursivas. Se debe escribir el nombre completo de un microorganismo es decir género y especie. Cuando se habla de especies sin nombre, se utiliza la abreviatura “sp.” para referirse a una sola especie sin nombre, mientras que “spp.” después de un género se refiere a más de una especie sin nombre. [El Comité Internacional de Sistemática de Procariotas (ICSP)].*

**Cepas de reserva:** Cepas idénticas obtenidas mediante un único subcultivo de una cepa de referencia.

**Cepas de trabajo:** Subcultivos de microorganismos obtenidos a partir de las cepas de reserva para ser usados en los ensayos que lo precisen.

**Cultivos de referencia:** Subcultivo primario obtenido de una cepa de reserva

**Efecto de matriz:** Alteración o interferencia directa o indirecta en respuesta a la presencia de otros analitos o sustancias interferentes en la muestra [UNODC 2012].

**Especificidad:** Fracción de negativos totales correctamente asignados en el recuento presuntivo [UNE EN ISO 13843:2018].

**Estimación del sesgo (ebias):** Determinación del sesgo basado en el diseño experimental descrito en la norma ISO 16140-3. [ISO 16140-3:2021]

**Estimación del LOD<sub>50</sub>:** Determinación del LOD50 (Nivel de detección al 50% de probabilidad de detección) basado en el diseño experimental descrito en la norma ISO 16140-3. [ISO 16140-3:2021]

**Estimación de la incertidumbre por componente:** Es la incertidumbre resultante de las contribuciones individuales a la incertidumbre de la medición evaluadas por separado y que son combinadas matemáticamente utilizando la ley de propagación de la incertidumbre [ISO 29201:2012].

*NOTA 1. Las fuentes de incertidumbre a considerar son las debidas a los componentes operativos (matriz y submuestreo, dilución, suspensión final, incubación y lectura de los contajes) y los componentes intrínsecos.*

**Estimación de la incertidumbre por el enfoque global:** Se basa en un análisis estadístico de los resultados obtenidos cuando se analiza una serie de muestras. En el enfoque global no es necesario cuantificar cada una de las fuentes de error incertidumbre [ISO 29201:2012].

**Incertidumbre:** “Parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando.

*NOTA 1 El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación típica (o un múltiplo de ésta) o la semiamplitud de un intervalo con un nivel de confianza determinado.*

*NOTA 2 La incertidumbre de medida comprende, en general, varios componentes. Algunos pueden ser evaluados a partir de la distribución estadística de los resultados de series de mediciones y pueden caracterizarse por sus desviaciones típicas experimentales. Los otros componentes, que también pueden ser caracterizados por desviaciones típicas, se evalúan asumiendo distribuciones de probabilidad, basadas en la experiencia adquirida o en otras informaciones.*

*NOTA 3 Se entiende que el resultado de la medición es la mejor estimación del valor del mensurando, y que todos los componentes de la incertidumbre, comprendidos los que provienen de efectos sistemáticos, tales como los componentes asociados a las correcciones y a los patrones de referencia, contribuyen a la dispersión”. [Vocabulario Internacional de Metrología VIM].*

**Incertidumbre técnica:** Es la incertidumbre resultante de la variabilidad operativa asociada a las etapas técnicas del procedimiento analítico [ISO 19036:2019].

**Incertidumbre de la matriz:** Es la incertidumbre resultante de la medida en que la porción de ensayo no es verdaderamente representativa de la muestra de laboratorio [ISO 19036:2019].

**Incertidumbre de distribución:** Es la incertidumbre resultante de la variabilidad intrínseca asociada a la distribución de los microorganismos en la muestra, la suspensión inicial y las diluciones posteriores [ISO 19036:2019]

**Material de referencia:** Material suficientemente homogéneo y estable con respecto a una o más propiedades especificadas, que se ha establecido que es apto para su uso previsto en un proceso de medición [Guía ISO 30:2015].

*NOTA 1. Los usos pueden incluir la calibración de un sistema de medición, la evaluación de un procedimiento de medición, la asignación de valores a otros materiales y el control de calidad.*

**Material de referencia certificado:** Material de referencia (MR) caracterizado por un procedimiento metrológicamente válido para una o más propiedades especificadas, acompañado de un certificado de MR que proporciona el valor de la propiedad especificada, su incertidumbre asociada y una declaración de trazabilidad metrológica [Guía ISO 30:2015].

*NOTA 1. Los procedimientos metrológicamente válidos para la producción y certificación de MR se recogen, entre otras, en las Guías ISO 34 y 35.*

**Medio listo para uso:** Medio líquido, sólido o semisólido que se suministra en placas, botellas, tubos u otros recipientes en forma de producto listo para el uso [UNE-EN-ISO 11133:2014].

*NOTA 1. Incluye medio de cultivo finalizado, medio listo para su uso después de volver a fundirse, medio listo para su uso después de volver a fundirse y añadirse los suplementos (medio listo para su uso incompleto).*

**Medio Preparados:** Pueden ser a partir de formulaciones comerciales deshidratadas que requieren su rehidratación y procesamiento antes de su uso [UNE-EN-ISO 11133:2014].

*NOTA 1. Incluye medio completo, medio incompleto al cual se añaden los suplementos antes de su uso, medio preparado a partir de sus componentes individuales.*

**Método de referencia:** Es definido como un método aceptado ampliamente y reconocido internacionalmente, incluye estándares ISO o CEN, que son validados usando al menos un estudio interlaboratorio [ISO 16140-3:2021].

**Método alternativo:** Es un método de análisis que detecta o cuantifica, para una categoría dada de productos, el mismo analito como es detectado o cuantificado usando el correspondiente método de referencia [ISO 16140-3:2021].

**Límite de cuantificación:** Concentración más baja de analito que puede ser cuantificado con un aceptable nivel de precisión y veracidad bajo las condiciones de la prueba [ISO 16140-1:2016].

**Nivel de detección:** Concentración de analito medida, obtenida mediante un procedimiento de medición determinado, para el que la probabilidad de detección es x.

*NOTA 1. El termino nivel de detección es usado para métodos cualitativos en microbiología*

**Límite de detección:** Aplicado a análisis microbiológicos cualitativos – Número más bajo de microorganismos que se pueden detectar, pero en cantidades que no pueden estimarse exactamente [OMS: 2013].

**Lote de medio de cultivo; partida de medio de cultivo:** Unidad Homogénea y de trazabilidad completa de un medio, referida a una cantidad definida de un material básico, de un producto semiacabado o de un producto final, consistente en cuanto a tipo y calidad, y que ha sido fabricado dentro de un periodo de producción definido habiéndosele asignado un único número de lote (o partida).

**Repetibilidad:** Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad.

**Reproducibilidad:** Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad.

**Sensibilidad:** Fracción de positivos totales correctamente asignados en el recuento presuntivo. [UNE EN ISO 13843:2018].

**Sesgo:** Estimación de un error sistemático de medición, o la diferencia sistemática entre el valor cuantitativo asignado y la media de los resultados de las réplicas de medición [ISO 16140-1:2016, 2.9].

**Trazabilidad:** Capacidad para seguir la historia, la aplicación o la localización de todo aquello que está bajo consideración.

*NOTAS: Al considerar un producto, la trazabilidad puede estar relacionada con:*

- *el origen de los materiales y las partes;*
- *la historia del procesamiento;*
- *la distribución y localización del producto después de su entrega (ISO 9000:2015)*

*En el campo de la Metrología se acepta la definición dada en el apartado 6.10 del JCGM 200:2012; VIM:*

*Propiedad de un resultado de medición por la cual dicho resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medición por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones teniendo todas las incertidumbres determinadas. [Vocabulario Internacional de Metrología VIM].*

**Validación:** Es el establecimiento de las características de desempeño de un método y aportación de pruebas objetivas de que se cumplen los requisitos de desempeño para un uso previsto específico [ISO 16140-1:2016].

**Verificación:** Demostración de que un método validado se realiza, en manos del laboratorio, de acuerdo con las especificaciones del método determinadas en el estudio de validación y es apto para su uso previsto [ISO 16140-1:2016].

El principio general para la verificación de método es que el método a ser verificado haya sido validado. Sin embargo, algunos métodos de referencia no son todavía validados. Para la verificación de estos métodos seguir los protocolos indicados en la ISO 16140-3:2021.

## 5. RESPONSABILIDADES

### Comité Técnico:

- ✓ Revisar el contenido técnico del documento y sugerir mejoras o modificaciones al mismo.



**Director del Área de Laboratorios:**

- ✓ Identificar posibles riesgos que puedan generarse de la aplicación de este documento.
- ✓ Establecer control y cumplimiento de este documento, así como la revisión y/o modificaciones que se puedan generar por observaciones del personal técnico del SAE o Comité técnico o por actualización de documentos normativos de referencia.

**Personal técnico del SAE, evaluadores, laboratorios acreditados y en proceso de acreditación:**

- ✓ Conocer y cumplir con lo establecido en este documento en el proceso de acreditación de laboratorios microbiológicos.

## **6. DESCRIPCIÓN**

### **6.1. INTRODUCCION**

La Norma NTE INEN ISO/IEC 17025 y los Criterios Generales de Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración, CR GA01, establecen y complementan los requisitos establecidos en la norma con directrices específicas tanto para los evaluadores como para los laboratorios que realizan ensayos microbiológicos, los criterios que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración para demostrar competencia. Sin embargo, para la aplicación de estos requisitos en los laboratorios de ensayos que realizan ensayos microbiológicos se ha considerado adecuado establecer un conjunto de directrices que complementen dicha Norma y criterios y que son los que se facilitan en este documento, a manera de criterios específicos.

### **6.2. ESTRUCTURA DE LOS CRITERIOS A LA NORMA NTE INEN ISO/IEC 17025:2018**

A efectos de clarificar la estructura del presente documento debe entenderse que la palabra “debe” se utiliza para indicar las disposiciones que, al reflejar los requisitos de la NTE INEN ISO/IEC 17025, son obligatorios. La palabra “debería” se utiliza para indicar disposiciones que, no siendo obligatorias, son consideradas por el SAE como un medio reconocido de cumplir con los requisitos. Los laboratorios cuyos sistemas no sigan las recomendaciones del SAE de alguna manera solo podrán optar por la acreditación si pueden demostrar que cumplen la cláusula aplicable de la NTE INEN ISO/IEC 17025 y la intención de las directrices de un modo equivalente.

Los números y títulos colocados en letra negrita a partir del numeral 6.3 corresponden a los requisitos de la NTE INEN ISO/IEC 17025. No se incluyen los textos, dado que estos deben cumplirse en su totalidad.

Para facilitar la lectura del presente documento, para los criterios del SAE se mantiene la numeración del requisito de la Norma NTE INEN ISO/IEC 17025, únicamente con la inclusión de la letra CE antes del numeral respectivo, si existe varios criterios a una misma cláusula se enumerará en forma secuencial en cursiva iniciando desde el 1.

Ejemplo: CE.6.3.1.1 sería la directriz 1, desarrollada por el SAE, relativa al requisito de la cláusula 6.3.1 de la Norma.

El presente documento ha sido revisado por el Comité Técnico del Sector Laboratorios de Ensayo de Alimentos del SAE, el mismo que se encuentra conformado por los representantes de las partes interesadas del proceso de acreditación y con el aporte de expertos en microbiología.

### **6.3. DESARROLLO DE LOS CRITERIOS ESPECÍFICOS APLICABLES A LA NORMA NTE INEN ISO/IEC 17025 PARA LABORATORIOS MICROBIOLÓGICOS**

#### **6.2 Personal**

*CE 6.2.1.1 Los análisis microbiológicos deben ser realizados o supervisados por personal que demuestra competencia técnica ya sea a través del conocimiento, experiencia comprobada o titulación superior en microbiología o equivalente. Se admitirán otras titulaciones siempre que el personal tenga experiencia comprobada relacionada con el alcance de acreditación del laboratorio, la cual estará conforme al grado de complejidad*

*CE 6.2.2.1 La dirección del laboratorio debe asegurar que el personal haya recibido formación adecuada para que sean competentes en la realización de los ensayos y en el manejo de los equipos. Dicha formación incluirá entrenamiento en técnicas básicas, como preparación de placas, recuento de colonias, técnicas asépticas, etc., y la calificación se determinará aplicando criterios objetivos.*

#### **6.3 Instalaciones y condiciones ambientales**

*CE 6.3.1.1. El laboratorio debe garantizar que el ambiente dentro del cual se lleven a cabo los análisis microbiológicos no afecten la confiabilidad de los resultados de ensayo.*

*CE 6.3.1.2. Se debe organizar, construir y equipar las instalaciones de modo que se evite el riesgo de contaminación.*

NOTA 1: ver ISO 7218.

#### **Consideraciones de bioseguridad**

*CE 6.3.4.1. El diseño del laboratorio debe cumplir con los requisitos de seguridad, los cuales dependerán del tipo de microorganismo.*

*CE 6.3.4.2 En el laboratorio microbiológico se utilizará una indumentaria apropiada para el tipo de ensayos que se realicen (en caso necesario, con protectores del cabello, nariz y boca, barba, manos, pies, etc.).*

*NOTA 1: El personal se despojará de dicha indumentaria antes de abandonar el área. Esto es especialmente importante en los laboratorios de análisis de patógenos y de laboratorio de biología molecular, donde, por ejemplo, el paso de un área con una elevada carga de ADN a otra con una baja carga de ADN podría producir sin querer contaminación cruzada. En muchos casos será suficiente utilizar una bata de laboratorio.*

*CE 6.3.4.3 Las áreas asociadas con las muestras, los ensayos y las áreas generales deben ser independientes. No es aceptable que el laboratorio de microbiología ocupe una sola sala polivalente.*

*NOTA 1: El área analítica y sembrado debe estar separada de la de preparación de medios de cultivo y lavado de material. Cualquier tipo de separación utilizada debe garantizar que no se produzca contaminación cruzada entre todas las actividades del laboratorio.*

*NOTA 2: El área de lavado (después de la descontaminación) puede compartirse con otras áreas del laboratorio afines (por ejemplo: preparación de medios, esterilización de materiales, etc.) siempre que se adopten las debidas precauciones para evitar la transferencia de trazas de sustancias que podrían afectar negativamente al crecimiento microbiano.*

NOTA 3: Ver ISO 7218

*CE 6.3.4.4 Para laboratorios de microbiología que manejen microorganismos patógenos (grupo de riesgo II, III y IV- según la OMS) y de Biología Molecular deben contar mínimo con una cabina de flujo laminar para el desarrollo de sus ensayos.*

### **Limpieza y desinfección**

*CE 6.3.4.5 El laboratorio debe tener procedimientos o tener evidencia del cumplimiento de los siguientes parámetros:*

- *Aplicación de técnicas asépticas y plan de acción de desinfectantes.*
- *Prueba de efectividad antimicrobiana cuando lo amerite.*
- *Limpieza y desinfección regular de las superficies de trabajo, baños con agua, incubadoras, refrigeradoras, etc.*
- *Mediciones de la calidad microbiológica del aire.*
- *Mantenimiento y reemplazo de filtros en cabinas de flujo laminar.*
- *Eliminación de desechos y tratamiento de vertidos accidentales.*
- *Control de plagas (cuando aplique).*

*CE 6.3.4.6 Debe establecer un programa documentado de limpieza y desinfección para las instalaciones, equipos y superficies del laboratorio que tenga en cuenta los resultados de la vigilancia de las condiciones ambientales y la posibilidad de contaminación cruzada.*

*CE 6.3.4.7 Para control se debe determinar los criterios o límites microbiológicos con base en la experiencia del laboratorio o a referencias internacionales. En caso de que dichos niveles superen lo establecido, deben tomarse las acciones correctivas necesarias y describir las medidas a tomar para corregir las situaciones en caso de desviaciones.*

*CE 6.3.4.8 Cuando se utilice una única autoclave para separar las cargas de descontaminación y esterilización deben tomarse las debidas precauciones, que garanticen la limpieza eficaz de la autoclave, las cuales deben estar documentadas y registradas.*

## **6.4 Equipamiento**

*CE 6.4.3.1 Los equipos del laboratorio no deben moverse habitualmente entre las distintas áreas, para evitar una contaminación cruzada accidental.*

*CE 6.4.4.1 El laboratorio debe verificar que la caracterización de los medios isoterms (incubadoras, baños de agua, hornos, u otros) se realicen considerando la estabilidad de la temperatura, la uniformidad de la distribución de la temperatura y el tiempo requerido para alcanzar las condiciones de equilibrio.*

*CE. 6.4.6 Para refrigeradoras, congeladores o similares, se debe verificar la temperatura con un patrón trazable calibrado en el rango de operación del equipo a verificar. No se requiere de caracterización.*

*CE6.4.7.1 La frecuencia de las calibraciones y verificaciones se establecerá en función de la experiencia documentada y dependerá del uso, el tipo y el funcionamiento previo de los equipos.*

*CE 6.4.10.1. Los laboratorios deben controlar y registrar la temperatura de los medios isoterms, diariamente o según el uso [Eurachem 2013].*

NOTA 1: Ver ISO 7218

## 6.5 Trazabilidad metrológica

### Cepas de referencia

*CE.6.5.1.1 Se debe registrar toda la información necesaria para asegurar la trazabilidad a la colección de cultivo.*

*CE 6.5.2b)1 Para demostrar la trazabilidad, el laboratorio debe utilizar cepas de referencia de microorganismos obtenidos directamente de una colección nacional o internacional reconocida, cuando exista alguna. Alternativamente también podrían utilizarse cepas comerciales siempre que el laboratorio pueda demostrar en el momento de su uso que todas las propiedades relevantes son equivalentes a una colección de cultivo.*

*NOTA 1. Se recomienda verificar que el número de pases que ha realizado el proveedor previo a la comercialización no sea mayor a cuatro.*

*CE 6.5.2b)2 Las cepas de trabajo no deben ser subcultivadas para sustituir las cepas de reserva. Los derivados comerciales de las cepas de referencia pueden utilizarse solo como cepas de trabajo.*

*CE 6.5.2b)3 Se debe disponer de un procedimiento para la manipulación, almacenamiento, conservación, mantenimiento y uso de las cepas de referencia, cepas reserva y cepas de trabajo.*

*CE 6.5.2b) 4. La activación es una etapa necesaria y crítica y debe hacerse en los medios de cultivo indicados por la Colección. El laboratorio debe conservar registros de dicha etapa.*

## 6.6. Productos y servicios suministrados externamente: Reactivos y medios de cultivo

*CE 6.6.1.1 Se debe identificar todos los medios, reactivos, kits, diluyentes u otros de forma que se asegure su trazabilidad.*

*NOTA 1. Medios, kits, reactivos, diluyentes, suspensiones u otros, deben estar debidamente etiquetados indicando, según sea apropiado, identidad, concentración, condiciones de conservación, fecha de preparación, fecha de caducidad validada y/o períodos recomendados de almacenamiento. Se deben mantener registros según aplique y estos deben incluir: descripción, lote, fecha de recepción, apertura, apariencia, aprobación/ rechazo y firma o iniciales de la persona responsable.*

### Medios listos para su uso

*CE 6.6.1.2 Cuando el fabricante de los medios adquiridos listos para su uso o parcialmente completos esté amparado por un sistema de calidad reconocido (por ejemplo, la serie ISO 9000) y la calidad de los medios se controle de acuerdo con la norma ISO 11133, la información relevante (certificados) debe ser revisada para su aceptabilidad, pero no es necesario repetir el control de calidad. Los controles realizados por el laboratorio pueden consistir únicamente en comprobaciones iniciales para cada nuevo fabricante y comprobaciones indirectas mediante procedimientos de control calidad internos. En otras circunstancias, el control de calidad según la norma ISO 11133 debe realizarse completamente en cada lote recibido [Eurachem, 2013].*

*CE 6.6.2.1 El laboratorio tiene que estar debidamente informado de las especificaciones de calidad del fabricante y asegurarse que los criterios de aceptación de los ensayos de rendimiento de los fabricantes satisfacen sus propios requisitos internos [ISO 11133:2014].*

*Nota 1. La documentación emitida por el fabricante debe incluir: Nombre de los medios, incluido cualquier suplemento (si aplica), período de validez, criterios de aceptabilidad aplicados, condiciones de conservación, control del crecimiento de los microorganismos de interés y de los microorganismos no deseados (Productividad, selectividad) (con referencias a sus colecciones de cultivos) y controles físicos.*

*CE 6.6.2.2. Se debe asegurar que se siguen las instrucciones del fabricante en relación a las condiciones de almacenamiento, fecha de caducidad y utilización.*

### **Medios preparados**

*CE 6.6.2.3 Se debe contar con un procedimiento o instructivo, para la aceptación de medios de cultivos preparados en los que se evalúa la idoneidad de los mismos. Se debe mantener registros de la etapa de preparación de los medios de cultivo y los resultados de los ensayos de control de calidad realizados.*

*CE 6.6.2.4 Para la preparación de medios debe utilizarse agua destilada, des ionizada o de ósmosis inversa, salvo que el método del ensayo especifique otra cosa. La calidad del agua debe monitorearse periódicamente para verificar la conductividad y control microbiológico de Aerobios Mesófilos.*

*CE 6.6.2.5 Incluir dentro de los procedimientos una sistemática para el manejo de la disposición de los medios expirados o caducados.*

*CE 6.6.2.6 Cada nuevo lote de medio de cultivo, medios listos para su uso a los que se han añadido los suplementos, medios de confirmación, diluyentes u otros debe verificarse el rendimiento antes de su uso.*

*NOTA 1. La verificación se basará en controles de calidad físico, químico y microbiológico conforme a la ISO 11133:2014.*

*NOTA 2. Si el medio no es utilizado frecuentemente se debe establecer las frecuencias para realizar el control de calidad de los mismos periódicamente.*

## **7.2 Selección, verificación y validación de métodos**

*CE. 7.2.1.1 Los resultados deben evaluarse con métodos estadísticos adecuados para el análisis de datos [Eurachem, 2013].*

*CE 7.2.1.5 El laboratorio deberá verificar los métodos normalizados que utiliza para verificar que cumple con el desempeño requerido.*

*NOTA 1. El laboratorio debe definir si seguirá una validación o verificación de un método.*

*NOTA 2. La verificación de métodos aplica a:*

- *Métodos de referencia con datos de validación*
- *Métodos de referencia que aún no están validados completamente.*
- *Métodos alternativos validados, que han incluido un estudio interlaboratorio.*

*NOTA 3. Verificación es solo aplicable a métodos que han sido validados usando un estudio interlaboratorio.*

### **Características de desempeño requeridas para la verificación de métodos**

Para análisis microbiológicos en alimentos se realizará conforme a los lineamientos de la norma ISO 16140-3: 2021.

Métodos de normalizados con datos de validación

La verificación de métodos cualitativos y cuantitativos se debe realizar en dos partes:

- a.** Verificación de la implementación del método.
- b.** Verificación sobre el producto (alimento).

*NOTA 1. Antes de realizar la verificación del método, el laboratorio deberá consultar los informes de validación publicados por los organismos de normalización reconocidos como la fuente para el alcance de validación y para seleccionar los alimentos adecuados para la verificación.*

Verificación de la implementación del método tiene como objetivo demostrar la competencia del laboratorio para realizar el método validado de forma correcta.

*NOTA 1. Para métodos cualitativos, el laboratorio debe seleccionar un alimento usado en el estudio de validación, y perteneciente al alcance de aplicación del laboratorio. Para métodos cuantitativos, el laboratorio debe seleccionar cualquier alimento dentro del alcance de aplicación del laboratorio.*

La verificación sobre el producto (alimento) tiene como objetivo demostrar la competencia del laboratorio para realizar el método validado con los alimentos que se encuentren dentro del alcance de aplicación del laboratorio.

*NOTA 1. Para un alcance con rango amplio de alimentos (Matriz alimentos), se debe seleccionar un mínimo de 5 alimentos complejos cada uno de diferente categoría perteneciente al alcance de aplicación del laboratorio.*

*NOTA 2. Para un alcance con rango limitado de alimentos se debe seleccionar un mínimo de un alimento complejo por cada categoría de alimentos perteneciente al alcance de aplicación del laboratorio.*

*NOTA 3. Se deberá seguir la guía sobre cómo elegir alimentos complejos (difíciles) descrita en el Anexo B de la ISO 16140-3:2021.*

A continuación, se describen las características de desempeño requeridas para la verificación de un método.

### **Métodos cualitativos**

Estimación del LOD<sub>50</sub> en la verificación de la implementación del método y en la verificación del producto (alimento) [ISO 16140-3:2021].



### **Métodos cuantitativos:**

Desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio ( $S_{IR}$ ) en la verificación de la implementación del método [ISO 16140-3:2021].

La estimación del sesgo (eBias) se aplica para la verificación sobre el producto (alimento) [ISO 16140-3:2021].

*NOTA 1. Para la verificación sobre el producto, el laboratorio deberá evaluar un alimento complejo por cada una de las categorías de alimentos recogidas en el alcance de la validación o aplicación en el laboratorio [ ISO 16140-3:2021]*

### **Métodos normalizados sin datos de validación**

Métodos cualitativos: Estimación del LOD<sub>50</sub> en la verificación del producto (alimento) [ISO 16140-3:2021].

Métodos cuantitativos: La estimación del sesgo (eBias) se aplica para la verificación sobre el producto (alimento) [ISO 16140-3:2021].

*NOTA 1. Se deberá usar el Anexo F de la norma ISO 16140-3:2021.*

Para otros análisis microbiológicos

Métodos cuantitativos: Recuperación y reproducibilidad.

Métodos cualitativos: Limite de detección [Eurachem, 2013]

*NOTA 1. La norma UNE EN ISO 13843:2018 es la referencia utilizada para el establecimiento de las características de funcionamiento de métodos microbiológicos cuantitativos obtenidos al analizar muestras de agua.*

### **Características de desempeño requeridas para la validación de métodos**

Aplica para métodos no normalizados, los métodos desarrollados por el laboratorio y los métodos normalizados utilizados fuera de alcance previsto o modificados de otra forma.

*CE7.2.2.1. La validación de los métodos de ensayo debe reflejar las condiciones reales de ensayo. La extensión de la validación necesaria dependerá del método y su aplicación.*

*CE.7.2.2.1.1 Cuando la acreditación abarca diversos tipos de muestras (por ejemplo: alimentos), las diferencias debidas a las matrices deben tenerse en cuenta al momento de validar el método.*

*CE 7.2.2.2. El laboratorio debe demostrar que una versión modificada de un método cumple las mismas especificaciones que el método original.*

*CE 7.2.2.3.1 Los métodos cualitativos, deben ser validados estimando, cuando sea apropiado, su especificidad, sensibilidad, selectividad, límite de detección u otros parámetros [Eurachem, 2013].*

*CE 7.2.2.3.2 Los métodos cuantitativos deben ser validados estimando, cuando sea apropiado, especificidad, sensibilidad, veracidad, repetibilidad, reproducibilidad, límite de cuantificación u otros parámetros [Eurachem, 2013].*

*CE 7.2.2.4. Los laboratorios deben mantener los datos sobre validación de los sistemas de ensayo comerciales (kits) que utilicen. Estos datos pueden obtenerse de ejercicios de intercomparación o de datos sobre validación remitidos por los fabricantes y sujetos a la evaluación de una tercera parte (por ejemplo: AOAC). Si no se dispone de datos sobre validación o si éstos no son plenamente aplicables, el laboratorio será responsable de completar la validación del método.*

#### **7.4 Manipulación de los ítems de ensayo o de calibración**

*CE 7.4.1.1 El laboratorio debe registrar toda la información relevante y, en particular, lo siguiente, cuando aplique:*

- a. fecha y, cuando sea oportuno, hora de la llegada de la muestra;*
- b. estado de la muestra en el momento de su entrega y, cuando sea necesario, temperatura;*
- c. características de la operación de muestreo (fecha de muestreo, condiciones de muestreo)*
- d. desviaciones a las condiciones especificadas.*

*CE 7.4.1.2 Las muestras que se encuentren a la espera de ser analizadas deben almacenarse en condiciones adecuadas para reducir al mínimo cualquier modificación en la población microbiana presente. El laboratorio debe definir y registrar dichas condiciones de conservación.*

*CE 7.4.1.3 Las muestras deben conservarse hasta que se hayan obtenido los resultados del ensayo, o más tiempo según sea necesario. Cuando se sepa que algunas porciones de muestras de ensayo del laboratorio están altamente contaminadas, deben descontaminarse antes de su eliminación.*

*CE 7.4.1.4 Se debe mantener un procedimiento para la correcta eliminación de materiales contaminados.*

*CE 7.4.1.5 En el caso de muestras con alto nivel de contaminación se deben realizar las correspondientes diluciones decimales para permitir el recuento de las placas, dentro del intervalo que se establece en documentos de referencia (ej. normas ISO 8199 e ISO 7218)*

#### **7.5 Registros**

Ver ISO17025.

#### **7.6 Evaluación de la incertidumbre de medición**

*CE 7.6.1.1 Los distintos componentes individuales de la incertidumbre deben identificarse y demostrar que están bajo control y evaluar su contribución a la variabilidad de los resultados.*

#### **Para ensayos microbiológicos en alimentos**

La incertidumbre estándar combinada debe basarse en una de las dos opciones siguientes:

- a)** Estimación por separado de las siguientes componentes de incertidumbre:
  - Incertidumbre estándar por la técnica (variabilidad operativa)
  - Incertidumbre estándar de la matriz
  - Incertidumbre estándar de distribución

Las incertidumbres evaluadas por separado se combinan matemáticamente utilizando la ley de propagación de la incertidumbre (Guía ISO/IEC 98).



- b) Si es coherente con los protocolos del laboratorio y los requisitos del cliente, sólo la desviación estándar de la reproducibilidad.

*NOTA 1. La norma ISO 19036:2019 es la referencia utilizada para el cálculo de la incertidumbre de los resultados microbiológicos obtenidos en la cadena alimentaria.*

### **Para ensayos microbiológicos en aguas u otros**

La reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia), se considera con frecuencia el parámetro más adecuado de la incertidumbre de la medición. Se estima combinando los componentes separados de la incertidumbre determinados en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio (enfoque por componentes) o mediante experimentos especiales en los que las condiciones analíticas son variadas por diseño (enfoque global).

De manera práctica, se considera que la incertidumbre de los resultados está formada por la combinación de dos grupos de componentes:

Incertidumbre operativa (variabilidad operativa) + Incertidumbre de distribución (Variabilidad intrínseca)

El cálculo de la evaluación de la incertidumbre operativa se debe realizar mediante:

- El enfoque de componentes para la evaluación de la incertidumbre operativa ó
- El enfoque global para la determinación de la incertidumbre operativa

*NOTA 1. En el enfoque de componentes para la evaluación de la incertidumbre operativa, las contribuciones individuales a la incertidumbre de la medición (submuestreo, dilución, suspensión final, incubación y lectura) se evalúan por separado y se combinan matemáticamente utilizando la ley de propagación de la incertidumbre (Guía ISO/IEC 98). La estimación combinada producida puede denominarse reproducibilidad intralaboratorio cuando los componentes se determinan en condiciones de reproducibilidad dentro de un laboratorio.*

*NOTA 2. El enfoque global para la determinación de la incertidumbre operativa estima la incertidumbre combinada de los resultados finales del ensayo mediante un experimento basado en la duplicación de todo el proceso analítico y en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio.*

*NOTA 3. La norma ISO 29201:2012 es la referencia utilizada para el cálculo de la variabilidad de los resultados de las pruebas y la incertidumbre de medición de los métodos de enumeración microbiológica. Calidad de agua.*

*CE. 7.6.1.2 Para la técnica de Número más probable NMP se debe estimar su incertidumbre asociada.*

*CE 7.6.1.3 La estimación de Incertidumbre no es de aplicación a métodos cualitativos CEA-ENAC-20 Rev1]*

*CE. 7.6.1.4 De existir otros enfoques para el análisis y expresión de la incertidumbre de medida estos deberán ser sustentados técnicamente.*

## 7.7 Aseguramiento de la validez de los resultados

*CE 7.7.1.1 Las actividades de control de calidad deben realizarse en la medida de lo posible con muestras contaminadas naturalmente o inoculadas artificialmente y con muestras negativas (CEA-ENAC-20 Rev. 1).*

*CE 7.7.1.2. Se debe seguir un procedimiento en el que se especifique la metodología de contaminación de las muestras usadas en la validación y en los controles de calidad internos.*

*CE 7.7.2.1 Se debe establecer un programa de aseguramiento de resultados en que se contemple como actividades del control de calidad interno a:*

*Ensayos cuantitativos: Control de precisión, control de recuperación Ensayos*

*cualitativos: Control del límite de detección*

*Control de las condiciones de trabajo*

*NOTA 1. Control de las condiciones de trabajo proporciona información sobre la esterilidad de los medios y materiales auxiliares utilizados y en general, sobre la buena práctica en la realización de los ensayos (CEA-ENAC-20 Rev. 1).*

## 7.8 Informe de los resultados

*CE.7.8.1.2.1 El resultado no debe expresarse como “cero para una unidad definida” salvo que sea un requisito reglamentario. Los resultados de los análisis cualitativos deben expresarse como “detectado/no detectado” o “ausencia/presencia” de acuerdo al método de referencia utilizado por el laboratorio, en una cantidad o volumen de muestra definidos. También pueden expresarse en referencia al límite de detección del método.*

*CE7.8.1.2.2 En análisis cuantitativos, cuando el número de microorganismos esté bajo el límite de cuantificación, debe expresarse el resultado como menor al límite de cuantificación para una unidad definida.*

*CE.7.8.3.1 Cuando se incluya la incertidumbre de medición en los informes de resultados se debe indicar la norma de referencia utilizada para la estimación del cálculo de incertidumbre.*

## 7. REGISTROS

Ninguno

## CONTROL DE CAMBIOS

| Sección | Cambios  |
|---------|--|
| 2 y 3   | Cambio de año de la Norma NTE INEN ISO/IEC 17025 de 2006 a 2018.   |
| 3       | Se coloca nombre correcto de la norma 17025.<br>Cambio de año de la norma ISO/IEC 17011 de 2005 a 2017.<br>Cambio de año de la norma ISO/IEC 17000 de 2006 a 2020.<br>Cambio de año de la guía EURACHEM guide de 2002 a 2013 Segunda edición.<br>Nombre de la norma UNE EN ISO 11133:2014 de inglés a español.<br>Se incluyen las normas ISO 16140, ISO 7128:2007 y la ISO 19036:2019<br>Cambio de año de la norma UNE EN ISO 13843 de 2000 a 2018.<br>Se añade la norma ISO 29201:2012<br>Se elimina la guía ILAC-G27:06/2017 |
| 4       | Se incluyen las definiciones: Alcance de aplicación del laboratorio, alcance de validación, cepas de trabajo, estimación del sesgo, estimación del LOD <sub>50.</sub> , estimación de la incertidumbre por el enfoque  |

| Sección | Cambios   |
|---------|---|
|         | <p>global, estimación de la incertidumbre por componente, incertidumbre técnica, incertidumbre de la matriz, incertidumbre de distribución, medio listo para uso, medio preparados, método de referencia, método alternativo, nivel de detección, lote de medio de cultivo; partida de medio de cultivo.</p> <p>Se cambia definiciones: cepas de referencia, especificidad, material de referencia, material de referencia certificado, límite de cuantificación, repetibilidad, sensibilidad, sesgo, validación, verificación.</p>   |
| 6.3     | <p>Se eliminan los siguientes numerales:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>4. Requisitos relativos a la gestión</li> <li>5. Requisitos técnicos</li> <li>5.2 Personal</li> <li>5.3 Instalaciones y condiciones ambientales</li> <li>5.4 Métodos de ensayo y de calibración y validación de los métodos</li> <li>5.5 Equipos</li> <li>5.6 Trazabilidad de las mediciones</li> <li>5.7 Muestreo</li> <li>5.8 Manipulación de los ítems de ensayo o de calibración</li> <li>5.9 Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo y de calibración.</li> <li>5.10 Informe de los resultados</li> </ul> <p>Se incluyen los siguientes numerales</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>6.2 Personal</li> <li>6.3 Instalaciones y condiciones ambientales</li> <li>6.4 Equipamiento</li> <li>6.5 Trazabilidad metrológica</li> <li>6.6. Productos y servicios suministrados externamente: Reactivos y medios de cultivo.</li> <li>7.2 Selección, verificación y validación de métodos</li> <li>7.4 Manipulación de los ítems de ensayo o de calibración</li> <li>7.5 Registros</li> <li>7.6 Evaluación de la incertidumbre de medición</li> <li>7.7 Aseguramiento de la validez de los resultados</li> <li>7.8 Informe de los resultados</li> </ul> |