

**PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARA EL MÉTODO HORIZONTAL DE
DETECCIÓN DE *Salmonella* spp EN MUESTRAS DE ALIMENTO PARA
CONSUMO ANIMAL DE UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE UNA
EMPRESA AVÍCOLA DE BUCARAMANGA EN EL AÑO 2017.**

**EDWARD ANTONIO VELASCO RODRIGUEZ
TATIANA ANDREA PRADA RODRIGUEZ
ANA MARIA FONSECA ALMANZAR**

**UNIVERSIDAD DE SANTANDER UDES
FACULTAD DE CIENCIAS ECONÓMICAS, ADMINISTRATIVAS Y CONTABLES
ESPECIALIZACIÓN EN GERENCIA DE LA CALIDAD Y AUDITORIA EN LOS
SERVICIOS DE SALUD
BUCARAMANGA, SANTANDER
2017**

**PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARA EL MÉTODO HORIZONTAL DE
DETECCIÓN DE *Salmonella* spp EN MUESTRAS DE ALIMENTO PARA
CONSUMO ANIMAL DE UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE UNA
EMPRESA AVÍCOLA DE BUCARAMANGA EN EL AÑO 2017.**

**EDWARD ANTONIO VELASCO RODRIGUEZ
17751024**

**TATIANA ANDREA PRADA RODRIGUEZ
17751014**


**ANA MARIA FONSECA ALMANZAR
17751011**

**PROYECTO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO OPTAR AL
TÍTULO DE ESPECIALISTA EN GERENCIA DE LA CALIDAD Y AUTORIA EN
LOS SERVICIOS DE SALUD**

**DIRECTOR(A)
MATHA LUCÍA HINCAPIÉ LÓPEZ**

**UNIVERSIDAD DE SANTANDER UDES
FACULTAD DE CIENCIAS ECONÓMICAS, ADMINISTRATIVAS Y CONTABLES
ESPECIALIZACIÓN EN GERENCIA DE LA CALIDAD Y AUDITORIA EN LOS
SERVICIOS DE SALUD
BUCARAMANGA, SANTANDER
2017**

ACTA DE SUSTENTACIÓN ESCANEADA

 Universidad de Santander <small>UNIVERSIDAD DE SANTANDER</small>	DIRECCIÓN DE POSGRADOS	
	ACTA SUSTENTACIÓN TESIS POS-FT-012-UDES	Fecha: 24/02/2017 Versión: 04

ACTA EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE GRADO

En Bucaramanga, a los catorce (14) días del mes de diciembre de 2017, en cumplimiento de los requisitos exigidos para la culminación del trabajo de grado, se llevó a cabo la evaluación de:

TÍTULO DEL TRABAJO DE GRADO:

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARA EL MÉTODO HORIZONTAL DE DETECCIÓN DE *SALMONELLA* SPP EN MUESTRAS DE ALIMENTO PARA CONSUMO ANIMAL DE UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE UNA EMPRESA AVÍCOLA DE BUCARAMANGA EN EL AÑO 2017

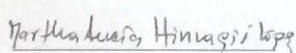
PROGRAMA:	ESPECIALIZACIÓN EN GERENCIA DE LA CALIDAD Y AUDITORÍA EN SERVICIOS DE SALUD		
CÓDIGO	PRIMER APELLIDO	SEGUNDO APELLIDO	NOMBRE (S)
17751024	Velasco	Rodríguez	Edward Antonio
17751014	Prada	Rodríguez	Tatiana Andrea
17751011	Fonseca	Almanzar	Ana María

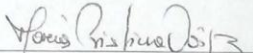
DIRECTOR TRABAJO DE GRADO: Martha Lucía Hincapié López c.c. 41.897.861 de Armenia


DOCENTE EVALUADORA: María Cristina Vásquez c.c. 35.456.118 de Bogotá


CONCEPTO EVALUADORES: APROBADO
CALIFICACIÓN: CUATRO PUNTO UNO (4.1)

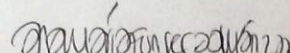
En constancia firman:


Martha Lucía Hincapié López
Director Trabajo de Grado


María Cristina Vásquez
Evaluadora


Edward Antonio Velasco R.
Estudiante


Tatiana Andrea Prada R.
Estudiante


Ana María Fonseca A.
Estudiante

DEDICATORIA

A Dios por su ayuda espiritual, porque siempre ha sido mi guía en cada sueño, en cada meta, en cada paso que doy; a mi familia por su eterno amor y apoyo incondicional en todo momento y en cada situación de mi vida, a mi prometido por creer en mí siempre y ser parte de este logro, porque sin ellos este sueño no sería realidad.

Tatiana A. Prada Rodríguez

A Dios por concederme la salud y la sabiduría para lograr mis metas, a mis padres por su cariño y apoyo incondicional todos los días para que logre mis metas, a los profesores por brindarme su conocimientos, a mi jefe por darme el permiso para realizar mis estudios, y a todas las personas que están cerca de mí siempre apoyándose de una u otra forma para lograr mis objetivos

Edward A. Velasco Rodríguez.

A aquellas personas que de manera directa o indirecta participaron aportando sus conocimientos, experiencias, consejos, brindándome paciencia, y lo más importante acompañándome en los momentos de dificultad y alegría; todo esto sin duda no hubiese sido capitalizado sin la incondicionalidad de cariño que me otorgaron mis padres, por quienes he llegado hasta aquí, y por quienes seguiré avanzando, pues ellos son mi fuente de motivación y curiosidad para seguir buscando nuevas experiencias. Las palabras se quedan cortas para testimoniar aquí todo mi aprecio y amor hacia ustedes. Por todo, GRACIAS TOTALES!

Ana María Fonseca Almanzar.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido un puente para interactuar más allá de lo que pudimos imaginar, y de las cuales recordaremos muchos momentos, por eso queremos agradecerles en las líneas de este apartado.

Especial nuestro agradecimiento a los propietarios de las instalaciones de laboratorio, por la confianza, por creer en este proyecto y permitir el uso de información para el correcto procedimiento y monitoreo de este trabajo con responsabilidad a lo largo de estos meses.

A la Dra. Martha Lucía Hincapié López, Directora de Tesis, por su constante y paciente seguimiento, por su asistencia, y disposición para compartir su tiempo de manera tan generosa durante el desarrollo de este trabajo; a la Dra. Natalia Uribe por su gran dirección técnica, y los conocimientos compartidos en lo respecto a la validación y su proceso, porque sin ella hubiera resultado dificultoso el desarrollo del protocolo para la validación.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	10
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	12
2. JUSTIFICACION	13
3. OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
4. MARCO REFERENCIAL.....	15
4.1 MARCO TEORICO.....	15
4.2 MARCO CONTEXTUAL	17
4.3 MARCO LEGAL	18
5. METODOLOGIA.....	19
5.1 TIPO DE ESTUDIO	19
5.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	19
5.2.1 UNIVERSO.....	19
5.2.2 MUESTRA	19
5.2.3 MUESTREO	19
5.3 CONSIDERACIONES ÉTICAS	19
6. RESULTADOS	20
7. DISCUSION.....	31
8. CONCLUSIONES.....	32
9. RECOMENDACIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXOS	36

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. FORMATO CONTROL ENTRADA A PERSONAL EXTERNO	38
ANEXO 2. FORMATO CALIBRACIÓN, VERIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE EQUIPOS- INGRESO DE MEDIOS, REACTIVOS E INSUMOS- CONTROL DE MEDIOS DE CULTIVO.	39
ANEXO 3. FORMATO LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN- CONTROL ESTERILIZACIÓN-CONTROL UV CABINA DE FLUJO LAMINAR- CONTROL TEMPERATURA Y HUMEDAD	40
ANEXO 4. FORMATO CORRECCIÓN TEMPERATURA	41
ANEXO 5. FORMATO INGRESO MUESTRAS DIARIO- CODIFICACIÓN DE LA MUESTRA- TEMPERATURA DEL PRODUCTO.....	42
ANEXO 6. CONTROL CALIDAD CEPAS DE REFERENCIA- CALIDAD DEL AGUA PLANTAS	43
ANEXO 7. FORMATO CONCENTRACIONES DEL INOCULO	44
ANEXO 8. FORMATO REGISTRO DE CONTROLES	45
ANEXO 9. FORMATO REGISTRO DE VALIDACIÓN DE LOS ANALISTAS.	46
ANEXO 10. FORMATO RESULTADO VERDADERO POSITIVO, VERDADERO NEGATIVO PARA CADA PRODUCTO.	47
ANEXO 11. PROCESO DE ESTERILIZACIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTO CONCENTRADO Y MATERIAS PRIMAS PARA EL MÉTODO DE VALIDACIÓN.	48
ANEXO 12. FORMATO INFORME DE VALIDACIÓN	49
ANEXO 13. PRESUPUESTO	51
ANEXO 14. CRONOGRAMA.....	52

RESUMEN

TÍTULO: Protocolo de validación para el método horizontal de detección de *salmonella* spp en muestras de alimento para consumo animal de un laboratorio de microbiología de una empresa avícola de Bucaramanga en el año 2017.

AUTORES: Velasco Rodríguez, Edward Antonio; Prada Rodríguez, Tatiana Andrea; Fonseca Almanzar, Ana María; Hincapié López, Martha Lucía.

PALABRAS CLAVE: Validación, NTC-ISO/IEC 17025, ISO 16140, NTC 4574, *Salmonella* spp.

DESCRIPCIÓN

La NTC-ISO/IEC 17025 como sistema de gestión de la calidad estipula requisitos para la competencia de los laboratorios ítem 5.4, hace énfasis en la validación de los métodos y en conjunto con la ISO 16140 se da cumplimiento, porque establece los lineamientos para la realización del protocolo de validación, contribuyendo al proceso de acreditación ante el Organismo Nacional de Acreditación de Colombia. Así, en el campo de la microbiología la NTC 4574 destaca la importancia de inocuidad de un alimento, en este caso concentrados y materias primas, evitando la contaminación por *Salmonella* spp en los animales y posteriormente en el ser humano, previniendo de este modo las pérdidas económicas que acarrear los altos costos de tratamientos y los reprocesos para el sector.

El propósito de este estudio fue establecer el protocolo de validación para el método horizontal de detección de *Salmonella* spp en muestras de alimento para consumo animal de un laboratorio de microbiología, dando cumplimiento al ítem 5.4 de la NTC-ISO/IEC 17025 avanzando en el proceso de acreditación de este ensayo en una empresa avícola de Bucaramanga en el año 2017, para lo cual se revisaron diferentes métodos de validación.

El resultado obtenido fue el protocolo de validación y documentación de soporte. Con el objeto de generar un valor agregado al cliente y mejorar la competencia del laboratorio así como garantizar resultados técnicamente válidos, se decide establecer un protocolo de validación para dar inicio a la implementación del ítem 5.4 “métodos de ensayo y de calibración y validación de los métodos” de la NTCISO-IEC 17025 y así dar avance al proceso de acreditación alineado con las buenas prácticas del laboratorio, y análisis de peligros y puntos críticos de control.

ABSTRACT

TITLE: Validation protocol for the horizontal method of detection of *Salmonella* spp in food samples for animal consumption of a microbiology laboratory of a poultry company in Bucaramanga in 2017.

AUTHORS: Velasco Rodríguez, Edward Antonio¹; Prada Rodríguez, Tatiana Andrea²; Fonseca Almanzar, Ana María³; Hincapié López, Martha Lucía⁴.

KEYWORDS: Validation, NTC-ISO/IEC 17025, ISO 16140, NTC 4574, *Salmonella* spp.

DESCRIPTION

The NTC-ISO / IEC 17025 as a quality management system stipulates requirements for the competence of laboratories item 5.4, emphasizes the validation of the methods and in conjunction with ISO 16140 is complied with, because it establishes the guidelines for the implementation of the validation protocol, contributing to the accreditation process before the National Accreditation Body of Colombia. Thus, in the field of microbiology NTC 4574 highlights the importance of food safety, in this case concentrates and raw materials, avoiding contamination by *Salmonella* spp in animals and later in humans, thus preventing losses costs that result in high treatment costs and reprocessing for the sector.

The purpose of this study was to establish the validation protocol for the horizontal detection method of *Salmonella* spp in food samples for animal consumption of a microbiology laboratory, in compliance with item 5.4 of the NTC-ISO / IEC 17025, advancing in the process of accreditation of this trial in a poultry company of Bucaramanga in 2017, for which different methods of validation were reviewed.

The result obtained was the validation protocol and support documentation. In order to generate added value to the client and improve the competence of the laboratory and guarantee technically valid results, it was decided to establish a validation protocol to start the implementation of item 5.4 "Test methods and calibration and validation of the methods "of the NTCISO-IEC 17025 and thus advance the accreditation process aligned with the good practices of the laboratory, and analysis of hazards and critical control points.

1. Bacteriólogo y laboratorista clínico. Universidad De Santander. Bucaramanga
2. Bacterióloga y laboratorista clínico. Universidad De Santander. Bucaramanga
3. Odontóloga. Universidad Santo Tomas. Bucaramanga
4. Bacterióloga Coordinadora Esp. Gerencia y Auditoria en servicios de salud. Universidad De Santander. Bucaramanga

INTRODUCCIÓN

Existen diferentes normas que ofrecen un sistema de gestión de la calidad bajo la NTC-ISO/IEC 17025 que nace de la ISO 9001 para avalar la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración en donde en su apartado 5.4 estipula la validación de los métodos de ensayo (NTC-ISO/IEC 17025, 2005); Para dar cumplimiento a este apartado la ISO 16140 establece los lineamientos para la realización del protocolo de validación, (ISO 16140, 2003) definiéndose el termino de validación de métodos analíticos como la confirmación mediante procedimientos de que dicho método es apto para el uso indicado; al realizar una validación se debe considerar la selección del método ya sea cualitativo si su fin es detectar presencia o ausencia del microorganismo de estudio, o cuantitativo si su objetivo es detectar valor numérico del microorganismo; también se debe considerar si el tipo de método a emplear es normalizado, es decir, si está basado en normas emitidas por organizaciones regionales, nacionales o internacionales; o si por el contrario es un método no normalizado donde puede tratarse de un método propio o desarrollado por el laboratorio; por otro lado también se puede hablar del método normalizado modificado donde se adapta una normativa y el laboratorio modifica algunas partes de esta.

Ya que la importancia de realizar validaciones de los métodos analíticos en el sector avícola radica en generar un producto que brinde seguridad, eficacia y calidad, disminuyendo el riesgo de falla en la calidad del resultado analítico, y demostrando la capacidad de generar resultados técnicamente válidos por parte del laboratorio, en el campo de la microbiología existe la norma Técnica Colombiana 4574 “*microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la detección de Salmonella spp*” (NTC 4574, 2007) con el fin de aportar a la inocuidad desde la primera parte de la cadena productora, en este caso, las materias primas como el maíz y las harinas de pescado, harina vísceras de pollo, harina pluma sangre y los concentrados para aves empleados en la alimentación animal evitando así la contaminación por *Salmonella* spp en los animales y posteriormente en el ser humano, previniendo de este modo las pérdidas económicas que acarrear los altos costos de tratamientos, y la mortalidad en los animales productores de alimentos para el sector.

Con el objeto de generar un valor agregado al cliente y mejorar la competencia del laboratorio se decide implementar el ítem 5.4 estableciendo un protocolo de validación para el método horizontal de detección de *Salmonella* spp en muestras de alimento para consumo animal, con el fin de dar avance al proceso de acreditación (obtener reconocimiento mediante auditoria de tercera parte) ante la ONAC (Organización Nacional de Acreditación de Colombia) alineado con las buenas prácticas de laboratorio y programas de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (HACCP)

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia con el paso del tiempo se han venido reglamentando lo referente a sistemas de calidad en donde la NTC- ISO/IEC 17025 define los requisitos que los laboratorios de ensayo y calibración deben cumplir para demostrar su competencia y capacidad de generar resultados técnicamente validos; esta norma comprende en una primera parte lo referente a la gestión documental y en una segunda parte hace referencia al componente técnico que el laboratorio debe implantar; en su apartado 5.4 establece que el laboratorio debe validar sus métodos de ensayo y así confirmar que estos son aptos para el fin previsto, además dando cumplimiento a este ítem se provee seguridad e inocuidad de los alimentos para consumo animal, ya que si no se controla la presencia de *Salmonella* spp desde la primera parte de la cadena o etapa de producción que es el control al alimento animal de aquí en adelante el microorganismo puede prevalecer a lo largo de la cadena de dicha producción y es ahí donde se presenta entre la comunidad consumidora de pollo intoxicaciones alimentarias a causa del microorganismo. (NTC-ISO 17025, 2005)

Teniendo en cuenta que la NTC 4574 establece que los productos destinados a la alimentación de animales (materias primas y concentrados) deben generar un resultado de Ausencia en 25 gramos para *Salmonella* spp, se hace importante reiterar la necesidad de validar los métodos obteniendo resultados confiables y de este modo evitar pérdidas económicas, reprocesos y perdidas de imagen para la empresa. Un estudio realizado por el Ministerio de Agricultura del Reino Unido sobre materias primas en 5 plantas de fabricación de alimento para consumo animal, arroja que para un total de 18 muestras analizadas de maíz el 5,6% contenía *Salmonella* spp, y en el caso de la harina de pescado de 44 muestras analizadas el 9,1% contenía el microorganismo. (Medina, 2012).

Otro estudio realizado por La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) detalla que para el 2007 los niveles de contaminación por el microorganismo en harina de pescado eran del 2,9%, para el 2008 de 2,1% y para el 2009 fue de 0,7% (Creus, 2011) haciéndose notoria la disminución de *Salmonella* spp por la implementación de los sistemas de calidad.

Por otra parte en la industria avícola empresas como BRF de Brasil cuenta con acreditación en su laboratorio de salud animal en la norma anteriormente citada lo cual le genera reconocimiento y posicionamiento entre una de las 10 principales productoras de pollo de Latinoamérica. (BRF Brasil Foods S.A) .

En México para el año 2009 el laboratorio de Alimentos Finos de Occidente S.A también logro acreditarse en la NMX-EC 17025 IMN-2006. De este modo y con el fin de mejorar la competencia de los laboratorios, en Colombia empresas como Incubadora Santander, Pimpollo S.A, San Marino, entre otras, han decidido implementar los requisitos de la norma y así lograr la acreditación obteniendo reconocimiento en el mercado brindando confianza en los resultados de todos su

métodos; es por ello que la implementación de las validaciones de los métodos dan avance al proceso de acreditación que contribuiría a la mejora continua de la calidad de los resultados por parte del laboratorio, dado que estos inciden de manera directa en las actividades económicas de la empresa.

1.1 Formulación del problema

¿Cómo establecer la validación para la detección de *Salmonella* spp en muestras de alimento para consumo animal, en una empresa avícola de la ciudad de Bucaramanga?

2. JUSTIFICACIÓN

Al realizar un análisis de los sistemas de calidad adoptados en los diferentes laboratorios avícolas a nivel nacional e internacional, se evidencia la necesidad de mejorar la competencia y generar un valor agregado al cliente demostrando que dichos resultados son técnicamente válidos y confiables, y teniendo en cuenta que hoy en día estos laboratorios de microbiología son indispensables, ya que permiten mediante la realización de pruebas, garantizar la salida de productos inocuos, en este caso para el consumo animal, se hace necesaria la implementación de sistemas de calidad como lo es la NTC-ISO/IEC 17025 para avalar la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. (NTC-ISO/IEC 17025, 2005)

Por tanto es de suma importancia implementar el ítem 5.4 de la norma que estipula como requisito del laboratorio validar todos sus métodos (NTC-ISO/IEC 17025, 2005) y de este modo avanzar en la visión institucional que comprende la acreditación ante la ONAC (Organización Nacional de Acreditación de Colombia) obteniendo no solo un beneficio interno al generar producto inocuo y aumento de la rentabilidad, sino también beneficio externo por alcanzar este reconocimiento, mejorando imagen de la empresa y ocupando posición competitiva frente a otras industrias avícolas acreditadas internacionales, (Organización Nacional de Acreditación de Colombia) además mantener vigente el registro otorgado por el ICA en el año 2007 mediante la resolución 1599, que lo reconoce como laboratorio de diagnóstico veterinario y dar cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Así mismo el presente trabajo aporta a los programas nacionales de erradicación de *Salmonella* spp estipulados por el ICA y FENAVI con el fin de disminuir la prevalencia del microorganismo a lo largo de la cadena de producción y así este no genere problemáticas a la salud pública y animal.

Dado lo anterior este trabajo se ha enfocado en establecer un protocolo de validación para el método de detección de *Salmonella* spp que usa el laboratorio para muestras de consumo animal, cuya detección y reporte del microorganismo está basado en la técnica descrita en la norma microbiológica NTC 4574, con el fin de generar lo anteriormente dicho. (NTC 4574, 2007)

Así mismo este trabajo guarda pertinencia con la formación recibida en la Especialización de Gerencia de la Calidad y Auditoria en Servicios de Salud, por el aporte al sistema de gestión de la calidad del laboratorio de microbiología al cumplir con uno de los requisitos de la NTC-ISO/IEC 17025 (NTC-ISO/IEC 17025, 2005).

De este modo no solo genera aporte al laboratorio donde se implantará dicha técnica, sino también a nivel personal y profesional con la adquisición de conocimiento que complementó al adquirido en la especialización.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer el protocolo de validación para el método horizontal de detección de *Salmonella* spp en muestras de alimento para consumo animal de un laboratorio de microbiología con el fin de dar cumplimiento en el ítem 5.4 de la NTC-ISO/IEC 17025 avanzando en el proceso de acreditación de este ensayo en una empresa avícola de Bucaramanga en el año 2017.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar el proceso de validación para el laboratorio de microbiología de la industria avícola de Bucaramanga.
2. Documentar el proceso de validación para el laboratorio de microbiología de la industria avícola de Bucaramanga.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 MARCO TEORICO

En la actualidad la calidad juega un papel importante en todos los procesos en las empresas ya que con ello se busca mejorar los servicios o productos que ofrecen, es por ello que existen diversos entes a nivel nacional e internacional que ayudan en este proceso, para el caso de los laboratorios se busca mejorar su sistema de calidad tanto en la parte de gestión como en la técnica donde es vital el validar los ensayos, por ello varias organizaciones como la ISO, UIQPA y la ONAC, brindan guías, normas o protocolos para ser adaptados o adoptados y así garantizar resultados más confiables. (Comisión del Codex Alimentarius, 2002).

Debido a esto la Organización Internacional de Estandarización (ISO) y la Comisión Electrónica Internacional (IEC), crean la forma ISO/IEC 17025, la cual es una modificación de la guía ISO/IEC 25 y de la Norma 45001, así como una agregación de apartados de la Norma ISO 9001/2000, por tanto se estipula que los organismos de acreditación que reconocen la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración deben basarse en esta norma para otorgar dicho reconocimiento. (NTC-ISO/IEC 17025, 2005). Es por ello que las validaciones, estipulado como requisito en el ítem 5 de la norma, son de gran importancia para los laboratorios de ensayo dado que establece su capacidad de satisfacción de los requisitos para su aplicación deseada, y estimaciones de características como el rendimiento analítico y diagnóstico de una prueba (Organización Mundial de Sanidad Animal OIE, 2016), además permite mayor confiabilidad en los resultados, especialmente cuando se trata de productos naturales donde es vital obtener datos y resultados experimentales que puedan demostrar su aptitud para el uso que se desea. (Gutiérrez Gaitén, Miranda Martínez, Varona Torres, & Rodríguez, 2000).

Para lograr validar el análisis deseado se debe incluir dos aspectos esenciales, el primero es la validación de parámetros de calidad del método y proceso y el segundo es la adecuación de estos mismos a unos requerimientos analíticos precisos determinado con anticipación, así como el definir el tipo de validación ya que este puede ser normalizado o no normalizado (Camaró Sala, Martínez-García, Olmos-Martínez, Catalá Cuenca, Ocete Mochón, & Gimeno Cardona, 2015); se entiende como método normalizado aquel que se basa en las normas emitidas por entidades regionales, nacionales e internacionales, y no normalizado donde se trata de un método propio o del laboratorio.

Por otra parte existen diversos tipos de modalidad de las validaciones en las que se encuentra la primaria y secundaria o también llamada verificación, en la primaria se basa en procesos exploratorios cuyo fin es establecer los límites

operacionales y las características del desempeño de un nuevo método modificado y debe dar origen a especificaciones numéricas y descriptivas del objeto de interés. La validación secundaria también llamada validación parcial, revalidación o verificación se da cuando el laboratorio quiere implementar un método desarrollado en otro lugar, y se basa en la reunión de evidencias en donde se conste que el laboratorio está en capacidad para cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria. (Camaró Sala, Martínez-García, Olmos-Martínez, Catalá Cuenca, Ocete Mochón, & Gimeno Cardona, 2015)

Para el caso de validaciones de métodos cualitativos y cuantitativos se evalúan parámetros como la especificidad, precisión, exactitud, límite de detección, linealidad y precisión (repetibilidad y reproducibilidad). (Ministerio de Salud Pública Cuba, 2013), también se usan normalmente mediciones estadísticas que ayudan a establecer si el método se encuentra dentro de un parámetro aceptable. Dentro de las mediciones estadísticas se encuentra la media, la desviación estándar, coeficiente de variación, distribución normal y varianza. (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010)

Respecto a la especificidad de un método cualitativo se refiere a su capacidad para detectar una gama de microorganismos que pueden estar presentes en la muestra y se pueden determinar a través del desarrollo del crecimiento en los medios de cultivo, determinando así la presencia o ausencia. Por otra parte el límite de detección se describe como el número más bajo del microorganismo en estudio que en una muestra puede detectarse, pero que no necesariamente se puede cuantificar. (Ministerio de Salud Pública Cuba, 2013)

Otros parámetros como la tolerancia que es el grado de precisión de los resultados de una prueba obtenidos mediante el análisis de las mismas muestras bajo diversas condiciones normales de la prueba como es el empleo de diversos instrumentos, lotes de reactivos, diferentes analistas y laboratorios, por lo cual hace que este parámetro de validación sea el más apropiado para determinar la metodología de una prueba por parte de un proveedor que cuente con múltiples instrumentos y lotes de los componentes. (Ministerio de Salud Pública Cuba, 2013)

Para el caso de la exactitud de un método microbiológico hace referencia al grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. Por otra parte el parámetro de la precisión hace referencia al grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar un procedimiento analítico repetidas veces bajo unas condiciones ya establecidas, y que esta depende solo de la distribución de errores aleatorios y que no tiene relación alguna con el valor verdadero o el especificado, y se expresa como el coeficiente de variación. (Camaró Sala, Martínez-García, Olmos-Martínez, Catalá Cuenca, Ocete Mochón, & Gimeno Cardona, 2015)

Por lo tanto cumplir con estos parámetros de validación aplicados al método de detección de *Salmonella* spp basados en la NTC 4574:2007 para el método horizontal para la detección de *Salmonella* spp en alimentos y alimentos para animales (NTC 4574, 2007), y así dar cumplimiento con lo estipulado en el ítem 5.4.5 de la NTC- ISO/IEC 17025 (NTC-ISO 17025, 2005), garantizando resultados más confiables y exactos, y de este modo mantener el registro otorgado por el instituto colombiano agropecuario (ICA), que se les da a los laboratorios de diagnóstico veterinario mediante la resolución 1599 de 2007 (Instituto Colombiano Agropecuario , 2007) y cumplir además con los manuales de buenas prácticas de laboratorio (BPL), y ser de gran ayuda a las plantas de alimentos y alimentos para animales en su otorgamiento de certificación mediante su sistema HACCP cuyo fin es el de identificar los peligros que alteren la inocuidad del alimento, de modo que se puedan prevenir tomando medidas de control y evitar así las pérdidas económicas para la industria.

4.2 MARCO CONTEXTUAL

El protocolo de validación se desarrolló para el laboratorio de microbiología de una industria avícola ubicada en la ciudad de Bucaramanga para el año 2017, con el fin de que el laboratorio dé cumplimiento al ítem número 5.4 (métodos de ensayo y de calibración y validación de los métodos) de la NTC-ISO/IEC 17025 y así avanzar en los requisitos de la norma para lograr su acreditación ante la ONAC. Por protección no se pueden precisar datos adicionales de la empresa. (NTC-ISO/IEC 17025, 2005) (Organización Nacional de Acreditación de Colombia)

4.3 MARCO LEGAL

Tipo de documento	Requisito	Emitido por	Fecha de emisión	Descripción
Norma ISO 16140: 2003	Microbiología de la cadena alimentaria. Validación del método – parte 1: vocabulario	ISO	01/05/2003	Define términos generales y definiciones relacionadas con la validación de métodos de microbiología en la cadena alimentaria. (ISO 16140, 2003)
Norma NTC-ISO/IEC 17025: 2005	Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.	ICONTEC	26/10/2005	Permite la acreditación de los laboratorios de ensayo y calibración. (NTC-ISO/IEC 17025, 2005)
Norma NTC 4574: 2007	Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la detección de <i>Salmonella</i> spp.	ICONTEC	21/03/2007	Esta norma describe los métodos horizontales para la detección de <i>Salmonella</i> spp. Aplica a productos para consumo humano y para alimentación animal, las muestras ambientales en el área de la producción y manipulación de alimentos. (NTC 4574, 2007)
Norma NTC 4491-1	Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Parte 1. Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y de diluciones decimales.	ICONTEC	24/08/2005	Preparación de diluciones. (NTC 4491-1, 2005)

5. METODOLOGIA

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo

5.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

5.2.1 Universo

Técnicas de laboratorio avícola

5.2.2 Muestra

Técnica basada en la norma 4574 del laboratorio avícola

5.2.3 Muestreo

No probabilístico por conveniencia ya que es propósito del laboratorio de la empresa avícola establecer un protocolo de validación y su implementación con el fin de dar avance a un proceso de acreditación en sus ensayos.

5.3 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Esta investigación se ajusta a las normas establecidas en la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.

De acuerdo con los principios establecidos en el artículo 11 del capítulo I, la investigación es considerada sin riesgo, ya que se revisó normativa con el fin de consolidar información requerida para el protocolo de validación para el método tradicional en la identificación de *Salmonella* spp en muestras avícolas de modo que el laboratorio pueda implementarlo para avanzar en el proceso de acreditación en la NTC-ISO/IEC17025; Así como los datos consultados directamente en la empresa e incluidos en este documento, fueron tratados acogiendo lo contemplado por la ley 1581 de 2012 emanada por el Ministerio de Tecnologías de la Información y las Comunicaciones, que regula el tratamiento de datos e información suministrada y sus principios rectores.

6. RESULTADOS

PROCOLO DE VALIDACIÓN

1. PROPÓSITO
Establecer los lineamientos para validación del método horizontal de detección de <i>Salmonella</i> spp en muestras de alimento para consumo animal concentrados de aves y materias primas como maíz, harina de pescado, harina vísceras de pollo y harina pluma sangre teniendo en cuenta la Norma Técnica Colombiana 4574.
2. ALCANCE
El presente documento comprende: <ul style="list-style-type: none">➤ Plan de validación➤ Instrumentos para la recepción de muestras➤ Informe de validación <p>Este protocolo aplica para el área técnica del laboratorio de microbiología de la empresa avícola (Director técnico y profesionales asistentes del laboratorio) ubicado en Bucaramanga y deberá ser consultado por los responsables de la ejecución.</p>
3. PLAN DE VALIDACIÓN
Este plan de validación comprende los pre-requisitos necesarios para la posterior realización de la validación del método; estos pre requisitos son necesarios para asegurar que no existen factores que alteren la validación o el resultado de esta. <ul style="list-style-type: none">➤ Revisar la entrada del personal externo al laboratorio. (Anexo 1)➤ Revisar mantenimientos, calibraciones y verificaciones de los equipos a usar en la validación verificando que cumplen con lo estipulado en el ítem 5.6 de la NTC-ISO/IEC 17025. (Anexo 2)➤ Evaluar reactivos que van a ser utilizados (verificar su etiquetado, condiciones de almacenamiento, temperatura de almacenamiento según su clasificación y/o peligrosidad). (Anexo 2)➤ Verificar el control de calidad de las cepas de referencia y del agua a usar. (Anexo 6)➤ Control de temperaturas y humedad que deben realizarse según el estipulado por el laboratorio y registrarse en su debido formato. (Anexo 3-4)➤ Verificar esterilización mediante UV en la cabina de flujo laminar (todos los días, 2 veces al día) (Anexo 3)➤ Verificar esterilidad de los medios preparados y listos para usar (ver procedimiento de la preparación de medios de cultivo del laboratorio).➤ Competencia del profesional: verificar que el analista está calificado para realizar la validación, que cuenta con capacitaciones o estudios necesarios para realizar este tipo de ensayos.➤ Verificar limpieza y desinfección de las áreas del laboratorio.(Anexo 3)

Nota: estos registros deben diligenciarse en los formatos correspondientes.

4. REFERENCIAS

NTC 4574:2007. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.

ISO 16140:2003. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal- protocolo de validación de métodos alternativos

NTC-ISO/IEC17025: 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensay y calibración.

NTC 4491-1. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Preparación de muestras para ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales.

5.FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La NTC 4574 describe los métodos horizontales para la detección de *Salmonella* spp. Se aplica a productos para el consumo humano y para alimentación animal, las muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos.

La presente técnica para la detección de *Salmonella* spp en alimentos, describe un esquema general que consiste de 5 pasos básicos:

- **Pre-enriquecimiento medio líquido no selectivo:** Es el paso en donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permitiendo restaurar las células de *Salmonella* dañadas, logrando así una condición fisiológica estable.
- **Enriquecimiento medio líquido selectivo:** Se realiza a partir de un medio de cultivo que contenga dos condiciones, por un lado debe incrementar las poblaciones de *Salmonella* y por el otro inhibir otros microorganismos presentes en la muestra.
- **Siembra en medios selectivo:** Se utilizan medios selectivos que restrinjan el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* spp y que permitan el reconocimiento visual característico de colonias sospechosas.
- **Identificación bioquímica:** Este paso permite determinar la actividad metabólica del microorganismo (*Salmonella* spp).
- **Serotipificación:** Es una técnica inmunológica (antígeno-anticuerpo) que permite la identificación específica del microorganismo en estudio (*Salmonella* spp). (NTC 4574, 2007)

6. PERSONAL QUE LLEVARA A CABO LA VALIDACIÓN

6.1 Director Técnico:

Requisitos:

- Título profesional en Bacteriología, microbiología, microbiología agrícola o veterinaria.
- Matricula o tarjeta profesional reglamentados por la ley.
- Experiencia en avicultura y laboratorio de diagnóstico aviar mayor a 2 años.

- Capacitación de la norma ISO 17025.
- Auditor de la norma ISO 17025.
- Alto liderazgo.
- Facilidad para expresarse y comunicarse con los demás.
- Capacidad de organizar, evaluar y controlar los procesos y el personal.

Funciones:

- Inventario, comprobación de mantenimiento y calibración de los equipos.
- plan de muestreo, Revisar y aprobar las muestras para la validación de la técnica, Autorizar la compra de los materiales y reactivos
- Seguimiento de las actividades programas y seguimiento al personal encargado de llevarlas a cabo.
- Liberación del informe
- Proveer los recursos necesarios para asegurar la calidad requerida en las actividades del laboratorio.
- Asegurar el cumplimiento de la norma ISO 17025 y BPL
- Asegurar la competencia del personal que opera equipos específicos, realiza ensayos, evalúa los resultados y firma los reportes de resultados.
- Gestión de programas de formación y las auditorías internas de ISO 17025 y BPL
- Revisar y aprobar la documentación del sistema de aseguramiento de calidad del laboratorio

6.2 Coordinador de calidad

Requisitos:

- Título profesional en Bacteriología, microbiología, microbiología agrícola.
- Matrícula o tarjeta profesional reglamentados por la ley.
- Capacitación de la norma ISO 17025
- Auditor de la norma ISO 17025
- Experiencia mayor a 2 años.
- Capacidad de organizar, evaluar y controlar los procesos y el personal.
- Capacidad de toma de decisiones.

Funciones:

- Mantener disponible la versión vigente de los documentos para su consulta.
- Identificar y comunicar los cambios requeridos para mantener la documentación actualizada.
- Autorizar si se detiene el análisis de la muestra por el contrario se continúa con el análisis, según la importancia si es mayor o menor el trabajo no conforme
- Evaluarla solicitud presentada por el interesado en ingresar al laboratorio.
- Realizar los controles de calidad a las cepas
- Programar los mantenimientos y calibraciones de los diferentes equipos
- Verificar que los mantenimientos y calibraciones se realicen según cronograma
- Supervisar los procedimientos de las verificaciones de los equipos
- Capacitar al personal sobre el manejo de los equipos
- Autorizar el manejo de los equipos al personal
- Determinar las funciones de los diferentes cargos
- Asegurar el cumplimiento de la norma ISO/IEC 17025:2005

- Colaborar en la revisión del sistema de gestión de calidad
- Verificar que el sistema de calidad sea implementado y respetado

6.3 Bacteriólogos y/o Homólogos:

Requisitos:

- Título profesional en Bacteriología, microbiología, microbiología agrícola.
- Matricula o tarjeta profesional reglamentados por la ley.
- Experiencia mayor a 6 meses.
- Capacitación de la norma ISO 17025

Funciones:

- Verificación de la calidad de las muestras y materiales para la realización de las validaciones.
- Realización de las validaciones del método.
- Reportar las no conformidades reales o potenciales y oportunidades de mejora que sean detectadas en sus respectivos procesos, durante el desempeño de las funciones asignadas.
- Detección de necesidades de material, equipos y/o servicios
- Comunicación de las necesidades al responsable de la administración de esta actividad el coordinador de calidad.
- Identificar y comunicar los cambios requeridos para mantener la documentación actualizada.
- Implementar los lineamientos documentales en su puesto de trabajo.
- Realizar las actividades conforme a lo establecido en este documento.
- Conocer los fundamentos de cada prueba
- Manejar correctamente los equipos
- Saber cuáles son las temperaturas y condiciones ambientales para el montaje de los diferentes ensayos
- Interpretar de manera correcta los resultados obtenidos de los análisis.

7. DESARROLLO

7.1 Selección del método

Método normalizado (NTC 4574: 2007).
Método Cualitativo: Presencia /Ausencia

7.2 Establecimiento del protocolo

Durante la ejecución del protocolo de validación se deberán documentar todas las actividades realizadas junto con los resultados obtenidos.

7.2.2 Selección de matriz

Matriz de alimento para consumo animal materias primas (maíz, harina de pescado, harina vísceras de pollo, harina pluma sangre) y concentrado para aves.

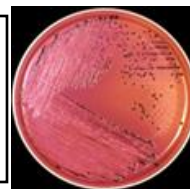
Nota: Para la toma de la muestra se debe seguir lo establecido en el manual de calidad del laboratorio en el apartado toma de muestras y envío al laboratorio.

7.2.3 Lista de equipos, materiales y reactivos

ETAPA	EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS
Preparación del inóculo	-Incubadora a 35±2°C -Cabina de Flujo Laminar	-Pipetas estériles, -Turbidímetro, -Tubos de ensayo estériles.	-Escala de Mcfarland, -Solución estéril -cepas ATCC 14028 <i>Salmonella enterica typhimurium</i>
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA			
Pre-enriquecimiento	-Balanza analítica, - Incubadora a 35±2°C -Cabina de Flujo Laminar	-Pipetas estériles.	-Agua peptona bufferada.
Enriquecimiento	- Incubadora 35±2°C y baño serológico 41.5°C en agitación. -Cabina de Flujo Laminar	-Pipetas estériles. - Tubos estériles.	-Caldo Rappaport Vassiliadis, -Caldo Tetrationato Mueller Kauffman
Siembra en medio selectivo	-Incubadora a 35±2°C. -Cabina de Flujo Laminar	Asas redonda y punta	Agar Rambach y XLD
Confirmación	-Incubadora a 35±2°C.	Laminas laminillas y	Antisueros (Antisuero Vi, O Poly A, B, C,D,E1), rapid ONE System.

7.2.4 Preparación del inóculo

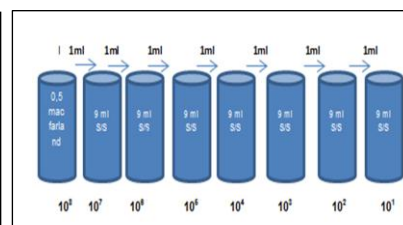
1. Tomar una Cepa ATCC 14028 *Salmonella* cepas ATCC 14028 *Salmonella* entérica sv *typhimurium* con buen crecimiento en el medio de cultivo y no mayor a 24 horas.



2. Seleccionar de 3 a 5 colonias y resuspender en 9ml de solución salina estéril.

3. Comparar turbidez con la escala Mcfarland de 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml), usando un turbidímetro.

4. Tomar 1 ml y sembrar en agar de recuento (Agar BHI) e incubar 24 horas a 35 °C, hacer recuento pasadas las 24 horas y de esta concentración realizar diluciones en base 10 del inóculo inicial ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) en 9 ml de solución salina, hasta llegar al factor 10^1 (7 diluciones de base 10)



5. Elegir la dilución donde sea contable y se realizan tres niveles de esta concentración (contaminación)

Nivel Alto entre: 10^3 UFC / ml
Nivel Medio entre: 10^2 UFC / ml
Nivel Bajo entre: 10^1 UFC / ml

6. Tomar 1 ml de cada nivel, suspenderlo en el medio (Agar BHI), por duplicado para corroborar la carga de UFC/ml. Incubar 24 horas a 35 °C, hacer recuento pasadas las 24 horas.

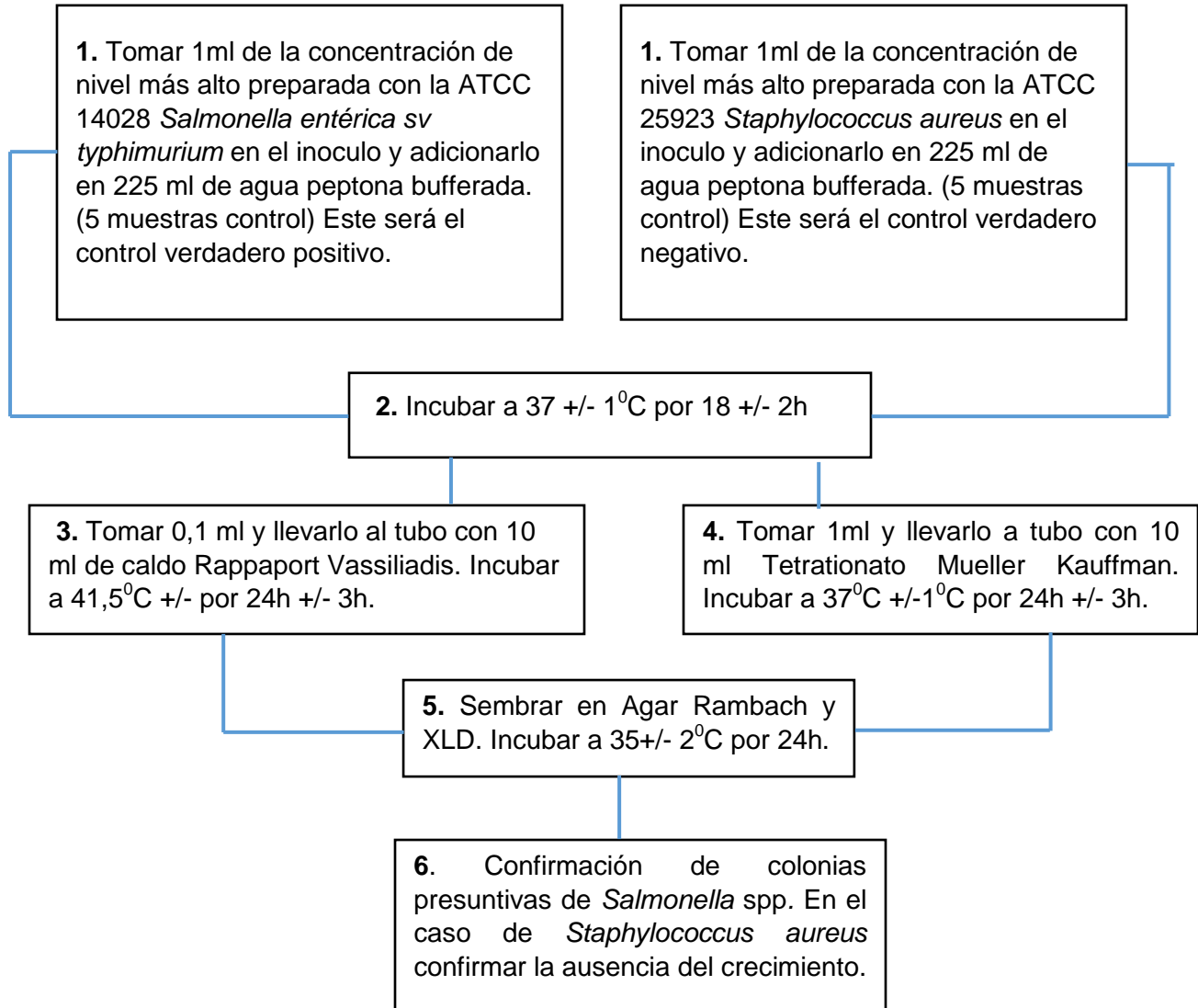
Nota: Guiarse por NTC 4491-1 Reglas generales para la preparación de suspensión inicial y diluciones decimales.

Nota: Realizar los mismos pasos con la cepa ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*.

Nota: Adaptado de Basic Farm- validación metodología Compact Dry

7.2.5 Preparación de controles (Verdadero positivo y Verdadero negativo)

Trabajar los controles con la concentración de nivel más alto: 10^3 UFC/ ml

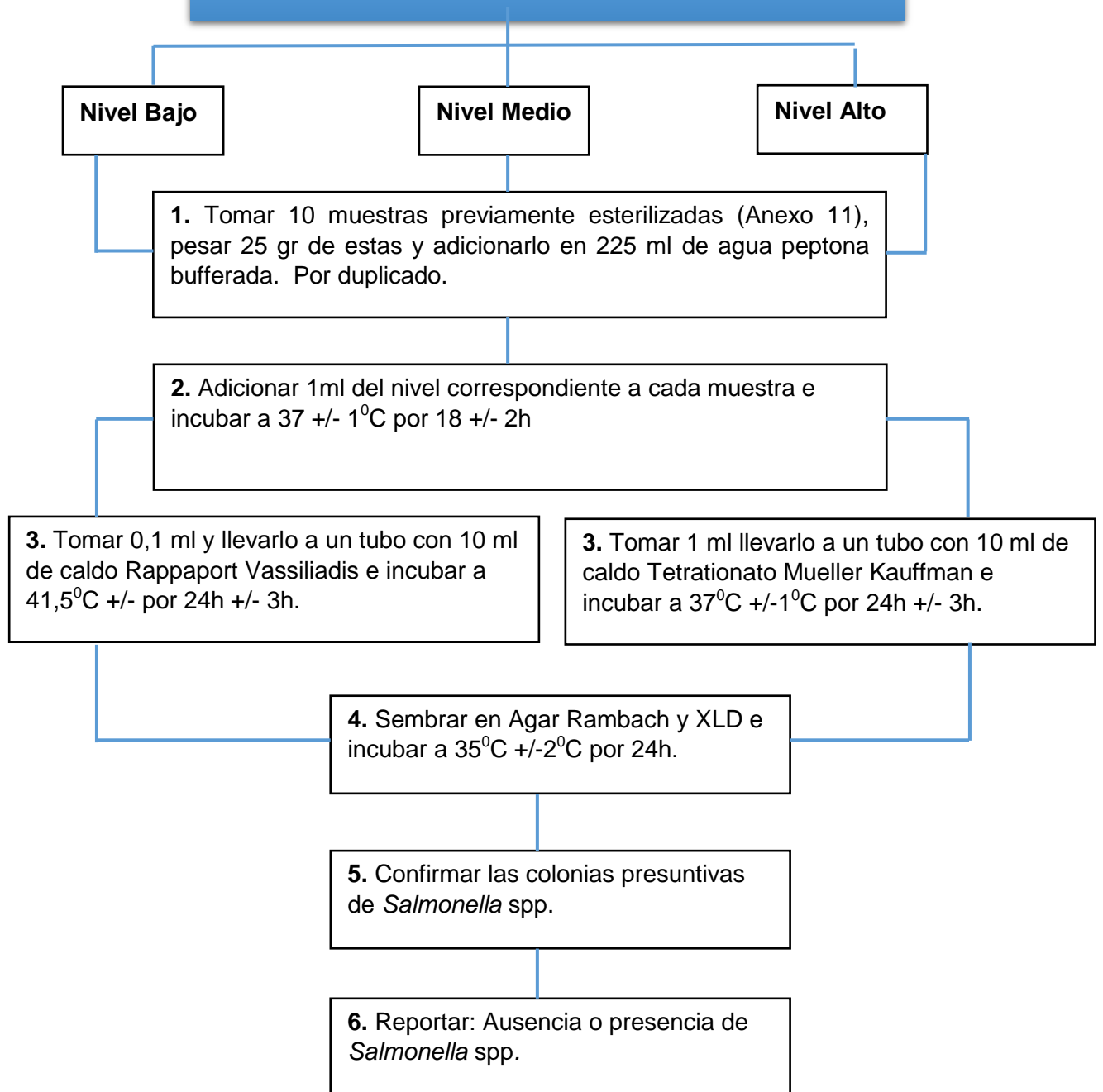


Nota: para realizar la confirmación de las colonias ver manual de técnicas de laboratorio el apartado pruebas de confirmación.

7.2.6 Preparación de las muestras y validación del ensayo

- Las muestras al ingresar al laboratorio se registran en los formatos correspondientes (Anexo 5) verificando el área de procedencia, el tipo de muestra, cantidad, fecha, su lote, y realizar la respectiva codificación de esta.
- El montaje de las muestras se llevara a cabo usando los tres niveles de contaminación (Concentración) previamente preparados en el ítem 7.2.4 preparación del inóculo. El total de la cantidad de muestras es de 5 por cada nivel de concentración con 5 controles verdaderos positivos y 5 verdaderos negativos.
 - 1 harina de pescado
 - 1 harina vísceras de pollo
 - 1 harina pluma sangre
 - 1 paquete de granos de maíz
 - 1 paquete de concentrado para aves (producto terminado)
- Las muestras se procesaran de forma duplicada, un nivel por día y sus resultados serán registrados en el formato correspondiente (Anexo 7-8-9-10)
- Dos (2) analistas se encargarán del procesamiento de la validación, se van a evaluar parámetros de reproducibilidad (10 muestras para los dos analistas) y repetibilidad (10 muestras por cada analista), además se evaluarán otros parámetros para el método cualitativo estipulados en el ítem número 8 del presente protocolo; para esto es necesario que previamente se dé cumplimiento a los requisitos establecidos en el plan de validación verificando que se cumplen con todas las condiciones requeridas tanto en ambiente, equipos y personal, con el fin que no existan factores que alteren los resultados de la validación.

Trabajar las muestras con los 3 niveles de contaminación:
Nivel Alto, Nivel Medio, Nivel Bajo.



Nota: para realizar la confirmación de las colonias ver manual de técnicas de laboratorio el apartado pruebas de confirmación.

8. PARÁMETROS DEL MÉTODO CUALITATIVO

Parámetro	Descripción	Formula
Límite de detección	Menor cantidad de analito que puede ser detectada en una matriz.	$LD = \frac{VP}{Ni} \times 100$ <p>Vp: Resultados positivos de muestras con inoculación baja Ni: Muestras inculadas</p>
Repetibilidad	Grado de concordancia entre resultados sucesivos obtenidos por el mismo método empleando un material idéntico bajo las mismas condiciones.	$R = \frac{N}{VP} \times 100$
Reproducibilidad	Variación observada entre los promedios de varios operadores.	$\% \text{ Reproducibilidad} = \frac{\sqrt{\left(\overline{K_2 \cdot x_D}\right)^2 - \left(\overline{K_1 R}\right)^2}}{T} \times 100 \% \quad (7)$
Eficacia relativa	Grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método con las muestras inculadas y las que no están inculadas.	$ER = \frac{VP+VN}{N} \times 100$

Especificidad	Capacidad del método de detectar muestras negativas cuando realmente son negativas.	$\text{Especificidad \%} = \frac{VN}{VN + FP} * 100$
Sensibilidad	Capacidad del método para detectar muestras positivas cuando realmente son positivas.	$\text{Sensibilidad \%} = \frac{VP}{VP + FN} * 100$

(Sánchez, y otros, 2010)

Nota. FP falsos positivos, FN falsos negativos, VP verdaderos positivos, VN verdaderos negativos, N número total de muestras examinadas

Plan de validación elaborado por		Firma	Fecha Elaboración
Nombres	Edward Antonio Velasco Rodríguez. Bacteriólogo y laboratorista clínico		02/11/2017
	Tatiana Andrea Prada Rodríguez. Bacterióloga y laboratorista clínico		
	Ana María Fonseca Almanzar. Odontóloga.		

Comentarios, observaciones o modificaciones al plan	Fecha	Firma

INFORME DE VALIDACIÓN

El informe debe contener:

- Nombre del laboratorio
- Fechas de realización del ensayo y de realización del informe.
- Identificación del método validado (Nombre completo del método).
- Tipo de método (cualitativo, cuantitativo) si es normalizado, no normalizado, Normalizado modificado o nuevo.
- Número, tipo y procedencia de las muestras utilizadas.
- Resultados de los ensayos (Falsos negativos, Falsos positivos, límite de detección, reproducibilidad, eficacia relativa, especificidad relativa, sensibilidad relativa), e Información sobre los equipos utilizados.
- Responsable de la validación.
- Los respectivos anexos (documentos que respalden la información, registros de equipos, protocolo o plan de validación y planillas de cálculos generados en el proceso).

Nota 1: Debe incluir el protocolo de validación.

Nota 2: El informe de validación debe ser revisado y aprobado por el responsable.

Nota 3: Ver anexo 12

7. DISCUSIÓN

Existen diferentes estudios que demuestran la importancia de validar los métodos ya que al realizarlo se puede asegurar resultados confiables; un estudio realizado en Perú en el año 2014, se realizó una validación de un método cromatógrafo, se concluyó que dicha validación servirá para detectar y tratar de forma temprana los casos más complicados de la enfermedad de tuberculosis y su monitoreo, ya que al comprobar la validez del método se puede implementar como parte del monitoreo del fármaco terapéutico. (Moreno & Grande Ortiz, 2014).

Suárez y colaboradores en Venezuela en el 2009, a través de un método cuantitativo para determinar magnesio eritrocitario empleando espectrofotometría, demostraron que la metodología analizada si cumplió con los parámetros mínimos de validación como la linealidad del método, su precisión y la exactitud del mismo. (Raibel Suarez, Linares, Ustáriz, & Hernández, 2009)

En Cuba en el 2010 se demostró mediante una investigación de estabilidad de Ribavirina inyectable por medio de cromatografía líquida de alta resolución, que su estudio resulto ser lineal, preciso, específico, exacto y robusto cumpliendo con los parámetros establecidos por el centro de control estatal de medicamentos. (Collado, Moreno López, García Peña, Gómez Carril, Barríos, & Begué, 2010).

En estados unidos en el 2017 se realizó una validación de un ensayo de amplificación isotérmica mediada por bucle de *Salmonella* en alimentos para animales entre los que estaban alimento para ganado, pollos, caballos, cerdos y dos alimentos para mascotas (alimento para gatos seco y para perro), este estudio consistía en comparar dos métodos, el método LAMP y el método por PCR cuantitativa tiempo real, los resultados obtenidos fueron satisfactorios lo cual concluyó que ambos análisis fueron específicos y sensibles para detectar *Salmonella* en alimentos para animales de manera que estos métodos pueden ser usados por laboratorios para la detección de rutina del microorganismo. (Domesle, Yang, Hammack, & Ge, 2017)

Otro estudio realizado también en estados unidos en el 2016 desarrolló y validó un método para detección y aislamiento de *Salmonella* en clavos de especias donde se concluyó que el método diseñado es sensible para el microorganismo y dado este resultado deciden realizar otros estudios de validación de este método en otras especias con sustancias antimicrobianas. (Zhang, y otros, 2017)

Ramírez en Colombia en el año 2013, (Ramirez, Olarte, Téllez, & Palma, 2013) publica una investigación de validación para determinar mercurio total en sangre, mediante el uso de espectrofotometría de absorción atómica, en donde se estableció un porcentaje de confiabilidad del 95% para los criterios de exactitud, precisión, estabilidad, linealidad, límite de detección y cuantificación de

incertidumbre, demostrando que este método cuantitativo validado si cumple con los criterios de aceptación de referencias utilizadas en su estudio.

Los resultados obtenidos en las investigaciones relacionadas en los párrafos anteriores, conforme a lo planteado en este estudio, emplearon una serie de normas, particularmente la NTC-ISO/IEC dando cumplimiento a lo estipulado en validaciones de sus métodos. (NTC-ISO 17025, 2005)

Teniendo en cuenta que en la actualidad los laboratorios de microbiología son una ayuda indispensable ya que permite mediante la realización de pruebas, garantizar que los productos elaborados por las empresas sean inocuos para el consumo animal, se reitera la importancia de validar cada método, (ISO 16140, 2003) así como se propuso a lo largo de este documento la implementación del protocolo de validación para el método horizontal de detección de *Salmonella* spp en muestras de alimentos para consumo animal.

8. CONCLUSIONES

- El establecimiento del protocolo de validación contribuirá al proceso de mejora en la gestión de la calidad y una vez se implemente en el laboratorio avícola, se dará avance en la NTC-ISO/IEC 17025, y que a corto plazo el laboratorio pueda solicitar acreditación.
- La caracterización del proceso de validación permitió la descripción detallada de cada paso a seguir en la validación, determinando lugar de realización del procedimiento, personal que implementará la técnica y como se ejecutará; cumpliendo con una serie de pre-requisitos que asegurarán la calidad en los resultados.
- Con el protocolo de validación que se estableció en este trabajo, servirá de base para que el laboratorio de microbiología de la industria avícola pueda realizar su proceso de validación para el método horizontal de la detección de *Salmonella* spp en muestras de alimento para el consumo animal.

9. RECOMENDACIONES

- Antes de realizar la validación verificar que se cumplan todas las condiciones estipuladas en los pre-requisitos. En caso contrario, tomar las medidas necesarias (correctivas, preventivas) que controlen resultados no conformes con el procedimiento.
- Ampliar y ajustar el protocolo propuesto en este trabajo, para los demás métodos de ensayo estipulados por las normas correspondientes en la identificación de otros microorganismos causantes de patologías, no solo en alimentos para consumo animal sino también en alimento para consumo humano; y de este modo dar cumplimiento total en el ítem 5.4 de la NTC-ISO/IEC que establece la validación de todos los métodos de ensayo del laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

BRF Brasil Foods S.A. *BRF. la calidad.*

Camaró Sala, M. L., Martínez-García, R., Olmos-Martínez, P., Catalá Cuenca, V., Ocete Mochón, M. D., & Gimeno Cardona, C. (21 de Noviembre de 2015). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología clínica*, 33(7), 31-36.

Collado, A., Moreno López, M., García Peña, M., Gómez Carril, M., Barríos, M. A., & Begué, M. (Diciembre de 2010). Validación del método analítico para el control de la calidad y estudio de estabilidad de ribavirina inyectable 100 mg/mL. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(4).

Comisión del Codex Alimentarius. (22 de Noviembre de 2002). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del codex sobre métodos de análisis y toma de muestras.validación por un solo laboratorio.Examen de las directrices armonizadas de la UIQPA para la validación. Budapest, Budapest, Hungría.

Creus, E. (2011). *factores que influyen en la contaminación por Salmonella en piensos.*

Domesle, K., Yang, Q., Hammack, T., & Ge, B. (18 de Octubre de 2017). Validation of a Salmonella loop-mediated isothermal amplification assay. *International Journal of Food Microbiology*, 264(2), 63-76.

Gutiérrez Gaitén, Y., Miranda Martinez, M., Varona Torres, N., & Rodríguez, A. T. (Enero- Abril de 2000). Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en Psidium guajaba, L. *Revista Cubana de Farmacia*, 34(1), 1-4.

Instituto Colombiano Agropecuario . (20 de Junio de 2007). *Resolucion 1599.*

Instituto de Salud Pública de Chile. (4 de Diciembre de 2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos.* Obtenido de Guía Técnica #1.

ISO 16140. (2003). *Microbiología de la cadena alimentaria. validación del método-vocabulario-Protocolo para la validación de métodos alternativos con un método de referencia* (1 ed.). (1, Ed.) Switzerland, Suiza: ISO.

Medina, C. (2012). *Engormix. Salmonella. Riesgos de Contaminación en Materias Primas y Piensos.*

- Ministerio de Salud Pública Cuba. (2013). *Centro para el control estatal de medicamentos equipos y dispositivos médicos*. Obtenido de Validación de métodos analíticos.
- Moreno, L., & Grande Ortiz, M. (Diciembre de 2014). Validación de un método de cromatografía líquida para la determinación de rifampicina en plasma humano. *Revista Peruana de medicina experimental y salud pública*, 31(1).
- NTC 4491-1. (2005). *NTC Microbiología de alimentos y alimentos para animales. suspensión de muestras para ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológico. parte 1. Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y de diluciones*. Bogotá: ICONTEC.
- NTC 4574. (2007). *Microbiología de alimentos, y alimentos para animales. Método horizontal para la detección de Salmonella spp*. Bogotá: ICONTEC.
- NTC-ISO 17025. (2005). *NTC-ISO 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. Bogotá: Incontec.
- NTC-ISO/IEC 17025. (2005). *NTC-IS 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. Bogotá: ICONTEC.
- Organización Mundial de Sanidad Animal OIE. (9 de Septiembre de 2016). 1) Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Manual acuático de la OIE. París, París, Francia.
- Orgnizaciòn Nacional de Acreditaciòn de Colombia. (s.f.). *Servicio de acreditaciòn*. Recuperado el 20 de Agosto de 2017, de Servicio de acreditaciòn.
- Raibel Suarez, E., Linares, L., Ustáriz, F., & Hernández, G. (27 de Mayo de 2009). Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario. *Avances en química*, 4(2), 53-62.
- Ramirez, C., Olarte, E., Téllez, E., & Palma, M. (4 de Diciembre de 2013). Validación del método analítico para la determinación de mercurio total en sangre humana. *Revista Colombiana de Química*, 42(3), 11-16.
- Sánchez, J. F., Tejea, M. H., Mora, J. L., Marroquìn, R., Hernàndez, V., Islas, V., y otros. (2 de Abirl de 2010). Validaciòn de mètodos analiticos no cuantitativos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacèuticas*, 41(2), 15-24.
- Zhang, G., Ali, L., Gill, V., Tatavarthy, A., Deng, X., Hu, L., y otros. (marzo de 2017). Development and Validation of a Cultural Method for the Detection and Isolation of Salmonella in Cloves. *Journal Of Food Protection*, 80(3), 376-382.

ANEXOS

Anexo 1. Formato control entrada a personal externo

FORMATO CONTROL ENTRADA A PERSONAL EXTERNO					
Fecha	Hora	Nombre	Empresa	Motivo	Firma

Fuente: Adaptado del Manual de Calidad del Laboratorio de Microbiología de Industria avícola de Bucaramanga.

Anexo 2. Formato calibración, verificación y mantenimiento de equipos- ingreso de medios, reactivos e insumos- control de medios de cultivo.

CALIBRACIÓN, VERIFICACIÓN Y MANTENIMIENTOS DE EQUIPOS						INGRESO MEDIOS, REACTIVO E INSUMOS.			CONTROL MEDIO DE CULTIVO									
Fecha		Mantenimiento		Procedimiento		Ejecuta	Revisa	Fecha ingreso			Fecha	Tipo de muestra	Resultado	Ejecuta	Corrección	Revisa		
	Cumple/ No cumple	Correctivo	Preventivo	Calificación	Calibración	Verificación			Presentación									
									Cantidad									
										Marca								
										Lote								
										F. vencimiento								
										Observación								
										Responsable								

Fuente: Adaptado del Manual de Calidad del Laboratorio de Microbiología de Industria avícola de Bucaramanga.

Anexo 3. Formato limpieza y desinfección- control esterilización-control UV Cabina de flujo lamiar- control temperatura y humedad

LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN				CONTROL ESTERILIZACIÓN			CONTROL ESTERILIZACIÓN CABINA			CONTROL TEMPERATURA Y HUMEDAD						
Area	Negativo	Positivo	Verificación: Prueba microbiologica de ambientes		Fecha	Resultado cinta indicadora	Resultado prueba biologica-sterikon	Fecha	Consumo de luz UV (Tiempo)		Firma	Día	Jornada	Hora	Temperatura	Humedad
			Rto Bacterias	Rto hongos					Antes	Despues						
Preparacion de medios												1	Mañana			
Microbiologia												2	Tarde			
Pesaje de muestras													Mañana			
Inmunologia												3	Tarde			
Recepción de muestras													Mañana			
Lavado de material												4	Tarde			
Exteriores													Mañana			
Almacenamiento temporal																

Fuente: Adaptado del Manual de Calidad del Laboratorio de Microbiología de Industria avícola de Bucaramanga.

Anexo 4. Formato corrección temperatura

	LABORATORIO XXXX	Código : LC-FCT - 13	
	PROCEDIMIENTO MANEJO DE EQUIPOS	Versión : 01	
	FORMATO CORRECCIÓN TEMPERATURA	Fecha emisión : Página 41 de 52	
CORRECCION TEMPERATURA			
Equipo:		Código:	
Datos certificado		Acciones del laboratorio	
Lectura equipo		Corrección de lectura	
Lectura equipo patrón			

Fuente: Adaptado del Manual de Calidad del Laboratorio de Microbiología de Industria avícola de Bucaramanga.

Anexo 5. Formato ingreso muestras diario- codificación de la muestra- Temperatura del producto.

INGRESO MUESTRAS DIARIO				CODIFICACIÓN DE LA MUESTRA			TEMPERTURA DEL PRODUCTO				Responsable
Fecha	Área	Tipo de muestra	Cantidad	Área	Tipo de muestra	Código	Producto	Lote	#muestra	Temperatura	
				Procesos especiales "P"	Materia prima "MP"	MpP#					
				Planta de concentrados "C"	Producto	AC #					
				Reproductoras "R"	Alimento "concentrado"	AR #					
				Pollo de engorde "E"	Alimento "concentrado"	AE #					
				Planta de Harinas "H"	Producto Harinas	ApH #					

Fuente: Adaptado del Manual de Calidad del Laboratorio de Microbiología de Industria avícola de Bucaramanga.

La codificación de las muestras del laboratorio se determinó de acuerdo al área y el tipo de muestra.

Los dos primeros números es el año, y son los últimos dos números del año.

Si es el año 2017 los primeros números del consecutivo serán 17

La primera letra mayúscula indica el tipo de muestra y la segunda letra mayúscula indica el área donde fue tomada la muestra, seguida por el número consecutivo que se lleve.

Anexo 6. Control calidad cepas de referencia- Calidad del agua plantas

CONTROL CALIDAD CEPAS DE REFERENCIA						CALIDAD DEL AGUA PLANTAS					
Fecha realización	Tinción		Crecimiento medio selectivo	Prueba rápida	Resultado	Realizado por	Fecha	Rcto	E. coli	Salmonella spp	Observaciones
	Gram	Azul de metileno									

Fuente: Adaptado del Manual de Calidad del Laboratorio de Microbiología de Industria avícola de Bucaramanga.

Anexo 7. Formato concentraciones del inoculo

<i>Salmonella</i> <i>entérica sv</i> <i>typhimurium</i>	Nivel Bajo 10 ¹ UFC / ml		Nivel Medio 10 ² UFC / ml		Nivel Alto 10 ³ UFC / ml	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
Recuento 1						
Recuento 2						
Ausencia						
Presencia						
<i>Staphylococcus aureus</i>						
Recuento 1						
Recuento 2						
Ausencia						
Presencia						

Fuente: Adaptado del Manual de Calidad del Laboratorio de Microbiología de Industria avícola de Bucaramanga.

Anexo 8. Formato registro de controles

Días	AUSENCIA/ PRESENCIA			
	Número de controles	Analista	Control positivo 103 UFC/ ml	Control negativo 103 UFC/ ml
Día 1	1	1		
		2		
	2	1		
		2		
	3	1		
		2		
	4	1		
		2		
	5	1		
		2		
Día 2	1	1		
		2		
	2	1		
		2		
	3	1		
		2		
	4	1		
		2		
	5	1		
		2		
Día 3	1	1		
		2		
	2	1		
		2		
	3	1		
		2		
	4	1		
		2		
	5	1		
		2		

Fuente: Adaptado del Manual de Calidad del Laboratorio de Microbiología de Industria avícola de Bucaramanga.

Anexo 9. Formato registro de validación de los analistas.

PRODUCTO		Dia 1 Nivel Bajo UFC				Dia 2 Nivel Medio UFC				Dia 3 Nivel Alto UFC				
MATERIA PRIMA	Harina Pluma de Sangre	Analista 1	Ausencia/Presencia	Analista 2	Ausencia/Presencia	Analista 1	Ausencia/Presencia	Analista 2	Ausencia/Presencia	Analista 1	Ausencia/Presencia	Analista 2	Ausencia/Presencia	
	Replica 1													
	Replica 2													
	PROMEDIO													
	Harina de Pollo													
	Replica 1													
	Replica 2													
	PROMEDIO													
	Harina de Pescado													
	Replica 1													
	Replica 2													
	PROMEDIO													
	Maiz													
	Replica 1													
	Replica 2													
PROMEDIO														
PRODUCTO TERMINADO	Concentrado para aves													
	Replica 1													
	Replica 2													
	PROMEDIO													

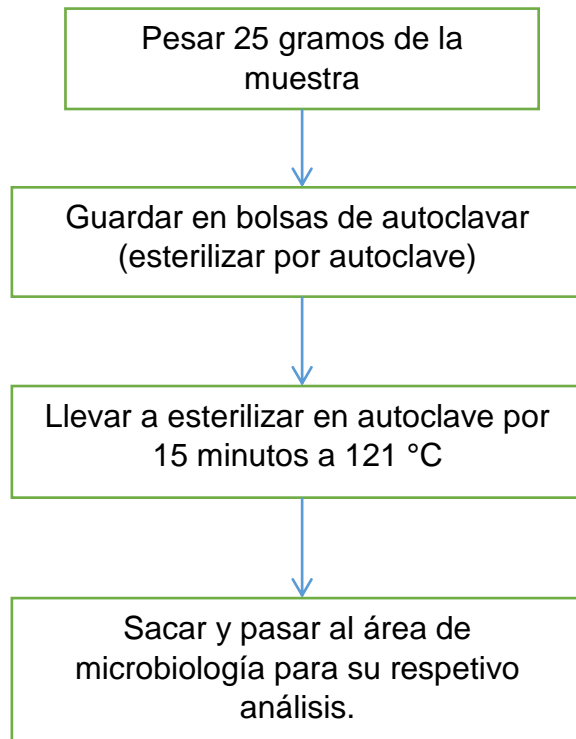
Fuente: Adaptado del Manual de Calidad del Laboratorio de Microbiología de Industria avícola de Bucaramanga.

Anexo 10. Formato resultado Verdadero Positivo, Verdadero negativo para cada producto.

PRODUCTO		
RESULTADOS	PRESENCIA	AUSENCIA
Resultado positivo	(VP)	(FP)
Resultado negativo	(FN)	(VN)

Fuente: Adaptado del Manual de Calidad del Laboratorio de Microbiología de Industria avícola de Bucaramanga.

Anexo 11. Proceso de esterilización de muestras de alimento concentrado y materias primas para el método de validación.



Fuente: Autores de proyecto

Anexo 12. Formato Informe de validación

INFORME DE VALIDACIÓN

Nombre de la Empresa		
Fecha realización del informe		
IDENTIFICACIÓN DEL MÉTODO VALIDADO		
Nombre completo del método:		
Tipo de método: Cualitativo <input type="checkbox"/> Cuantitativo <input type="checkbox"/>		
Normalizado <input type="checkbox"/> Normalizado modificado <input type="checkbox"/> No normalizado <input type="checkbox"/> Nuevo <input type="checkbox"/>		
Analito:	Responsable de validación	Director Técnico
Matriz:	Firma	
	Fecha	

TIPO Y PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS UTILIZADAS

RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS

FALSOS POSITIVOS, FALSOS NEGATIVOS			
Valor obtenido		Criterio de aceptación	
comentarios:			

LIMITE DE DETECCIÓN			
Valor obtenido		Criterio de aceptación	
comentarios:			

REPETIBILIDAD

Valor obtenido		Criterio de aceptación	
comentarios:			

REPRODUCIBILIDAD

Valor obtenido		Criterio de aceptación	
comentarios:			

EFICACIA RELATIVA

Valor obtenido		Criterio de aceptación	
comentarios:			

ESPECIFICIDAD RELATIVA

Valor obtenido		Criterio de aceptación	
comentarios:			

SENSIBILIDAD RELATIVA

Valor obtenido		Criterio de aceptación	
comentarios:			

ANEXOS

(Anexar al presente informe los documentos que respalden la información, registros de equipos, protocolo o plan de validación y planillas de cálculos generados en el proceso).

Revisado por:	Firma	Fecha
Nombre		
Cargo		

OBSERVACIONES

--

Anexo 13. Presupuesto

RUBRO	FUENTE (estimado en pesos colombianos)		
	UDES	EMPRESA DONDE LABORA	INVESTIGADORES
Evaluador 1 / 15 días		1.050.000	
Evaluador 2 / 15 días		1.050.000	
Evaluador 3 / 15 días		2.700.000	
Asesoría metodológica / 15 días	400.000		
Uso de bases de datos	100.000		
Compra NTC 4574			60.000
Compra NTC 4491 - 1/2005			80.000
Compra NTC-ISO 17025			63.600
Compra ISO 16140 - 1/2016			115.000
Insumos de papelería			200.000
Trabajo de campo			300.000
Sub-totales	500.000	4.800.000	818.600
TOTAL	\$6.118.600		

Fuente: Autores de proyecto

Anexo 14. Cronograma

Actividad	Tiempo en Meses								
	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero
1. Definición del tema	■								
2. Búsqueda bibliográfica (normatividad) para la validación	■	■	■	■	■				
3. Primera entrega del anteproyecto				■					
4. Aprobación por el comité de investigación				■					
5. Caracterización del proceso de validación.				■	■	■			
6. Documentación y soportes para el proceso de validación.					■	■	■		
7. Segunda entrega de proyecto					■				
8. Redacción discusiones y conclusiones.							■		
9. Entrega de documento final								■	
10. Sustentación de proyecto								■	
11. Correcciones del evaluador								■	
12. Entrega de proyecto a biblioteca									■

Fuente: Autores de proyecto