

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“ANÁLISIS, ACREDITACIÓN Y VALIDACIÓN EN EL ÁREA DE  
MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS Y AMBIENTAL EN LA  
EMPRESA CERTIFICACIONES Y CALIDAD S.A.C”**

Trabajo de Suficiencia Profesional para Optar el Título de:

**BIÓLOGO**

**XTOPHER QUISPE JURADO**

Lima – Perú

**2021**

---

**La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“ANÁLISIS, ACREDITACIÓN Y VALIDACIÓN EN EL ÁREA DE  
MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS Y AMBIENTAL EN LA  
EMPRESA CERTIFICACIONES Y CALIDAD S.A.C”**

Presentado por:

**XTOPHER QUISPE JURADO**

Trabajo de Suficiencia Profesional para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO**

Sustentado y aprobado por el siguiente jurado:

---

Dra. Doris Elizabeth Zúñiga Dávila  
Presidente

---

Mg. Sc. Katty Ogata Gutiérrez  
Miembro

---

Blgo. Juan G. Juscamaita Morales  
Miembro

---

Mg. Sc. Patricia Moreno Díaz  
Asesora

## **DEDICATORIA**

*A mis padres por su confianza y apoyo incondicional,  
por sus consejos, valores y por ser ejemplos de vida,  
que me motivó a nunca rendirme y poder culminar esta etapa.*

## **AGRADECIMIENTO**

*En primer lugar, quiero agradecer a Dios por darme la vida, por la salud y por todas las personas que puso en mi camino y que forman parte de mi vida.*

*Agradezco a mi padre, que me enseñó a levantarme cada vez que me sentía derrotado, demostrándome que con esfuerzo y decisión se puedo conseguir todo.*

*Agradezco a mi madre, que nunca me dejó solo en los momentos más complicados de mi vida y siempre tuvo palabras oportunas cuando más la necesitaba.*

*A mis hermanos, por siempre estar presentes aportándome buenas cosas a mi vida y por brindarme grandes momentos de felicidad.*

*A mis amigos, por sus palabras de apoyo y aliento en todo momento para poder terminar esta etapa.*

*A mi jefa Rosario Grados por su apoyo incondicional y por su confianza para con mi persona que me permitió desempeñarme laboralmente durante estos años.*

*A mi asesora Patricia Moreno, por su paciencia, sus sugerencias y constante apoyo en la revisión y ejecución del presente trabajo.*

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN EJECUTIVO .....	viii
EXECUTIVE SUMMARY .....	ix
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS .....	3
2.1. Objetivo general .....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
III. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS Y BEBIDAS .....	4
3.1. Conceptos previos .....	5
3.1.1. Inocuidad alimentaria .....	5
3.1.2. Microorganismos indicadores .....	5
3.1.3. Microbiología de los alimentos .....	5
3.1.4. Coliformes .....	5
3.1.5. Coliformes fecales o termotolerantes .....	6
3.1.6. Escherichia coli .....	6
3.1.7. Aerobios mesófilos.....	6
3.1.8. Listeria monocytogenes.....	7
3.1.9. Salmonella .....	7
3.1.10. Staphylococcus aureus .....	7
3.1.11. Clostridium perfringens.....	7
3.1.12. Patrón de referencia.....	8
3.2. Competencia y Autorización del Analista.....	8
3.3. Análisis Microbiológico de Alimentos y Bebidas.....	9
3.3.1. Normativa.....	9
3.3.2. Métodos acreditados.....	10
3.3.3. Análisis microbiológico de una muestra de embutidos.....	12

3.4. Análisis Microbiológico de Muestras de Agua .....	17
3.4.1. Normativa.....	17
3.4.2. Métodos acreditados.....	17
3.4.3. Análisis microbiológico de una muestra de agua residual .....	19
3.5. Aseguramiento de la Validez de los Resultados.....	21
3.5.1. Uso de materiales de referencia.....	22
3.5.2. Uso de patrones de verificación y comprobaciones intermedias en los equipos de medición .....	23
3.5.3. Repetibilidad de los ensayos .....	24
3.5.4. Correlación de resultados para diferentes características de un ítem .....	25
3.5.5. Revisión de los resultados informados .....	25
3.5.6. Comparaciones intralaboratorio .....	26
3.5.7. Muestras ciegas .....	27
IV. ACREDITACIÓN DE NUEVOS MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS .....	28
4.1. Conceptos Previos .....	28
4.1.1. Acreditación .....	28
4.1.2. Calidad del agua .....	28
4.1.3. Organismo de Evaluación de la Conformidad (OEC).....	29
4.1.4. Testificación .....	29
4.1.5. Competencia técnica.....	29
4.1.6. Veracidad.....	29
4.1.7. Precisión .....	29
4.1.8. Incertidumbre .....	29
4.2. Procedimiento General de Acreditación.....	30
4.3. Implementación .....	31
4.3.1. Revisión de normativa y selección de métodos.....	31

4.3.2. Calibraciones de equipos, adquisición de material de referencia, insumos .....	32
4.3.3. Competencia técnica.....	33
4.3.4. Incertidumbre .....	35
4.3.5. Pruebas de aptitud .....	35
4.4. Testificaciones .....	36
4.4.1. Recuento de Pseudomonas aeruginosa por filtración de membrana para una muestra de agua potable .....	37
<b>V. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR HUEVOS DE HELMINTOS .....</b>	<b>40</b>
5.1. Conceptos Previos .....	40
5.1.1. Validación .....	40
5.1.2. Helmintos .....	41
5.1.3. Método de ensayo normalizado.....	41
5.1.4. Método de ensayo no normalizado.....	41
5.1.5. Parámetros de validación.....	41
5.1.6. Agua de bebida.....	41
5.1.7. Agua de piscina .....	42
5.2. Procedimiento de Validación .....	42
5.2.1. Objetivo de la validación.....	43
5.2.2. Alcance del método .....	43
5.2.3. Documentos de referencia .....	44
5.2.4. Parámetros de validación y criterios de aceptación.....	44
5.2.5. Pruebas preliminares .....	46
5.2.6. Ejecución de pruebas.....	46
5.2.7. Desarrollo de parámetros.....	48
5.3. Resultados.....	54
5.3.1. Límite de detección y cuantificación.....	54
5.3.2. Sensibilidad, Especificidad, Falsos positivos y falsos negativos .....	54

5.3.3. Repetibilidad y Reproducibilidad.....	55
5.3.4. Porcentaje de recuperación (Veracidad).....	56
5.3.5. Robustez .....	57
5.3.6. Incertidumbre .....	58
5.4. Conclusión y Revalidación.....	59
VI. CONCLUSIONES .....	60
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
VIII. ANEXOS .....	67



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de Métodos Cualitativos Acreditados para el Análisis de Alimentos .....	11
Tabla 2. Lista de Métodos Cuantitativos Acreditados para el Análisis de Alimentos .....	11
Tabla 3. Lista de Métodos Semi-cuantitativos Acreditados para el Análisis de Alimentos	12
Tabla 4. Métodos Acreditados para el Análisis Microbiológico de Aguas .....	18
Tabla 5. Material de Referencia Microbiológico Utilizado.....	22
Tabla 6. Verificación de Equipos de Medición .....	24
Tabla 7. Lista de Métodos de Ensayo a Implementar.....	32
Tabla 8. Competencia Técnica para Recuento de Coliformes Totales por Membrana Filtrante. ....	34
Tabla 9. Incertidumbre para el Recuento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por Filtración de Membrana.....	35
Tabla 10. Tabla de Contingencia.....	49
Tabla 11. Test de Robustez de Youden-Steiner .....	52
Tabla 12. Factores de Evaluación para la Validación .....	53
Tabla 13. Tabla de Contingencia con Resultados.....	55
Tabla 14. Límite de Repetibilidad de cada Analista.....	56
Tabla 15. Límite de Repetibilidad y Reproducibilidad Global del Laboratorio.....	56
Tabla 16. Porcentaje de Recuperación por Analista para las Dos Matrices .....	57
Tabla 17. Robustez del Método para Cada Uno de los Factores Seleccionados .....	58
Tabla 18. Límites de Incertidumbre para Ambas Matrices .....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procedimiento de Entrenamiento, Evaluación y Autorización del Analista.....	9
Figura 2. Orden de Trabajo con los Análisis Respectivos para la Muestra de Embutido ...	13
Figura 3. Material y Equipo Utilizado para el Procesamiento Inicial de la Muestra .....	14
Figura 4. Informe de Ensayo de la Muestra de Embutido .....	16
Figura 5. Orden de Trabajo para la Muestra de Agua Residual (Industrial) .....	19
Figura 6. Informe de Ensayo de la Muestra de Agua Residual (Industrial) .....	20
Figura 7. Verificación de la Balanza Mediante el Uso de Pesas Patrón.....	23
Figura 8. Recuento de Aerobios Mesófilos en Placas de Agar Plate Count.....	26
Figura 9. Recuento de Coliformes en Placa con Agar Violeta Rojo y Bilis (VRBA).....	26
Figura 10. Procedimiento para la Acreditación Establecido por INACAL.....	31
Figura 11. Confirmación de una Colonia Típica de <i>P. aeruginosa</i> en Agar Leche .....	39
Figura 12. Esquema para el Proceso de Determinación de los Parámetros de Validación .	45
Figura 13. Distribución e Inoculación de las Muestras para las Pruebas Preliminares .....	47

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Tabla NMP para la Estimación de la Densidad Bacteriana Cuando se Utilizan 5 Tubos por Dilución. ....	68
Anexo 2. Tabla NMP para la Estimación de Densidad Bacteriana Cuando se Utiliza 10 Porciones de 10 ml Cada Una. ....	69
Anexo 3. Lista de Material de Referencia (cepas) del Laboratorio de Microbiología. ....	70
Anexo 4. Certificado de Calibración de la Incubadora con Código EMB-39. ....	71
Anexo 5. Certificado de Calibración del Baño de Agua con Código EMB-05. ....	72
Anexo 6. Competencia Técnica para Recuento de Coliformes Totales mediante Membrana Filtrante para Agua de Uso y Consumo Humano. ....	73
Anexo 7. Resultados de la Prueba de Aptitud para Agua Potable. ....	74
Anexo 8. Tamaño Relativo de Huevos de Helminetos. ....	75
Anexo 9. Material Utilizado para el Análisis de Huevos de Helminetos. ....	76
Anexo 10. Fotografía de Huevos de <i>Ascaris Lumbricoides</i> y <i>Toxocara sp.</i> ....	77
Anexo 11. Incubación de Placas para Recuento de Mesófilos Aerobios en Agar PCA. ....	78
Anexo 12. Colonias de Mesófilos Aerobios en Placa con Agar PCA. ....	79
Anexo 13. Filtración de la Muestra de Agua Residual Industrial. ....	80
Anexo 14. Evaluación de Caldo Lauril Sulfato Triptosa para Enumeración de <i>E.coli</i> ....	81
Anexo 15. Tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptosa con Producción de gas. ....	82
Anexo 16. Incubación de Caldo EC para Enumeración de <i>E.coli</i> . ....	83

## RESUMEN EJECUTIVO

Las enfermedades transmitidas por los alimentos, así como el uso de agua contaminada para distintos fines, constituyen dos problemas importantes para la salud y la economía a nivel mundial. Las normas nacionales e internacionales establecen requisitos que deben cumplir los alimentos y el agua para garantizar su inocuidad. Son los laboratorios los organismos encargados de evaluar el cumplimiento de estos requisitos; por tal motivo, es importante que sean organismos acreditados y que aseguren la emisión de resultados confiables. En el presente Trabajo de Suficiencia Profesional se demuestra la contribución del autor, a través de su formación académica y experiencia laboral, en mantener la competencia técnica del laboratorio y en lograr los objetivos trazados por el mismo. En la primera etapa se llevó a cabo el análisis de alimentos y muestras de agua, cumpliendo lo establecido en la norma NTP ISO/IEC 17025 para el aseguramiento de la validez de los resultados. Además, se aprobaron de manera satisfactoria las auditorías llevadas a cabo por INACAL, demostrando la competencia técnica del laboratorio. En la segunda etapa, como parte del objetivo de la empresa en querer incursionar en el sector ambiental, se logró la acreditación de nuevos métodos de ensayo para el análisis de distintas matrices de agua. Adicionalmente se aprobaron los exámenes de aptitud que permitieron demostrar el correcto desempeño del laboratorio en llevar a cabo los nuevos análisis. Finalmente, en la tercera etapa, se implementó el laboratorio de parasitología y se utilizó la validación como herramienta para tener un método que permitiera el análisis de huevos de helmintos en dos tipos de agua, logrando demostrar que el método elegido es adecuado para los fines previstos.

**Palabras claves:** Acreditación, Validación, Competencia técnica, helmintos.

## **EXECUTIVE SUMMARY**

Foodborne illness, as well as the use of contaminated water for different purposes, are two major global health and economic problems. National and international standards set out requirements that food and water must meet to ensure their safety. Laboratories are the bodies in charge of assessing compliance with these requirements; therefore, they must be certified organizations that ensure the issuance of reliable results. The present study develops how the author, through his academic training and work experience, contributed to maintaining the laboratory's technical competence and achieving the established objectives. In the first stage, the analysis of food and water samples was conducted in compliance with standard NTP ISO/IEC 17025 to ensure the results were valid. In addition, the audits carried out by INACAL (National Institute of Quality) were successfully passed, demonstrating the laboratory's technical competence. In the second stage, as part of the company's goal to participate in the environmental sector, new test methods for analyzing different water matrices were certified. Besides, proficiency tests were passed, which demonstrated the laboratory's accurate performance in carrying out the new analyses. Finally, in the third stage, the parasitology laboratory was implemented, and validation was used as a tool to find a method that would allow the analysis of helminth eggs in two types of water, proving that the chosen method is adequate for the intended purposes.

**Keywords:** certification, validation, technical competence, helminths

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente una de cada diez personas en el mundo se enferma y cuatrocientos veinte mil mueren por el consumo de alimentos contaminados al año. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se deben a la contaminación ante la deficiencia del manejo de estos desde la etapa de su elaboración hasta la comercialización de los mismos. Dentro de los principales contaminantes se encuentran las bacterias, virus, parásitos y/o sustancias químicas perjudiciales que pueden provocar más de 200 enfermedades, desde la diarrea hasta el cáncer (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2019) (OMS, 2019). Además, las ETA's no solo producen grandes pérdidas en la salud pública, también afectan negativamente la economía mundial (Arosquipa, 2014).

Por otro lado, la calidad del agua potable también es uno de los principales problemas a nivel mundial. La contaminación microbiana, físico-química y radioactiva afecta a la calidad del agua cuando no se cumplen los límites permisibles de cada uno de dichos parámetros. Las enfermedades más comunes y extendidas, asociadas con el consumo de agua, son causadas por bacterias, virus protozoos y helmintos (OMS, 2018).

En el Perú, en la década de 1950, se reportó un incremento de enfermedades ligadas al consumo de alimentos contaminados, como la fiebre tifoidea, teniasis por el consumo de carne de cerdo criado en malas condiciones, etc. Un ejemplo de estos fue el número de casos declarados para la tifoidea paratífica, siendo que en el año 1950 se reportaron 2551 casos, llegando a los 6690 para finales del año 1960, tal y como se declara en el informe bioestadístico de enfermedades transmitidas en el Perú, emitido por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social en setiembre de 1960. Como respuesta a este incremento, en el año 1963 se publica el Código Sanitario de Alimentos, que posteriormente se incorporaría como Reglamento Sanitario de Alimentos dentro del Código Sanitario de Salud en el año 1969, permaneciendo así hasta el año 1998. Finalmente, en el año 2008 se publica la Ley de Inocuidad de Alimentos que permite enfrentar de forma conjunta los peligros alimentarios, así como los principios para una alimentación saludable y segura (DIGESA, 2010). Sin

embargo, a pesar de todos estos esfuerzos por controlar los ETAS, se siguen reportando brotes en todo el país. Solo hasta la semana 15 del año 2019 se notificaron 22 brotes de ETA en 12 departamentos a nivel nacional con un total de 729 personas afectadas, de los cuales 214 fueron hospitalizados y 03 fallecieron a consecuencia de este daño. El 22.7 % de los brotes fueron ocasionados por *Salmonella sp.* y *Escherichia coli* (Ministerio de Salud [MINSAL], 2019).

En el 2016 se publicó un estudio sobre la calidad de agua para consumo humano realizado en tres regiones del Perú (Cajamarca, Huancavelica y Huánuco), encontrando que menos del 10% del total de muestras evaluadas tuvieron buena calidad microbiológica. Además, en tres cuartas partes de los hogares de Cajamarca, la tercera parte de Huancavelica y casi la quinta parte de Huánuco se encontró *E. coli* en el agua destinada al consumo humano (Tarqui et al., 2016).

Todo esto exige que los laboratorios de ensayo, encargados de evaluar los alimentos y agua, brinden servicios de calidad con resultados confiables; es decir, estos laboratorios deben demostrar su competencia técnica en la realización de los ensayos requeridos. Aquellos que prueben su competencia serán capaces de acceder a la acreditación otorgada por organismos acreditadores, siendo el Instituto Nacional de Calidad (INACAL) el organismo acreditador en el Perú. Además, esta acreditación pondrá en evidencia el sistema de gestión del laboratorio que le brindará la capacidad para producir resultados técnicamente válidos (ISO/IEC 17025, 2017).

La finalidad de esta monografía es demostrar la suficiencia profesional, adquirida durante la formación académica, a través del desempeño laboral como analista en las áreas de microbiología de alimentos y ambiental en la empresa CERTIFICAR S.A.C. Además, se pondrá énfasis en las actividades que permiten mantener el aseguramiento de la validez de los resultados, la competencia y la contribución del analista para el logro de objetivos trazados por el laboratorio ante la presencia de problemáticas.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

- Aplicar los conocimientos y competencias adquiridos en la carrera de Biología en los laboratorios de Microbiología y Parasitología de la empresa CERTIFICAL S.A.C.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Analizar las muestras de alimentos, bebidas y aguas ingresadas al laboratorio de microbiología y parasitología, manteniendo el aseguramiento de la validez de los resultados.
- Participar en el proceso de acreditación de nuevos métodos de ensayo para el análisis de distintas matrices de aguas, que permitirá incursionar en el sector ambiental.
- Participar en el proceso de validación de un método cuantitativo y cualitativo para el análisis de huevos de helmintos en agua, como parte del proceso de implementación del laboratorio de parasitología.



### **III. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS Y BEBIDAS**

CERTIFICAL S.A.C. es una empresa privada creada hace más de 10 años que brinda servicios de ensayos de laboratorio para el sector ambiental, alimentario, agroexportación y pesquería. Cuenta con laboratorios de ensayo y organismo de inspección acreditados por INACAL bajo la norma técnica peruana (NTP) ISO/IEC 17025:2017 y NTP ISO/IEC 17020:2012, respectivamente.

Dentro de sus laboratorios de ensayo encontramos el laboratorio de microbiología que al ser un laboratorio acreditado demuestra su competencia en base al cumplimiento de los requisitos establecidos en la NTP ISO/IEC 17025; así como, en los criterios, directrices y reglamentos establecidos por la dirección de acreditación de INACAL. Esta acreditación asegura que el laboratorio emita resultados confiables, veraces y que los informes de ensayos tengan validez internacional.

En este capítulo explicaremos en qué consistió la principal actividad desarrollada durante la etapa laboral: el análisis microbiológico de alimentos, bebidas y muestras de agua. Se demostrará cómo los conocimientos aprendidos y desarrollados durante la formación académica, principalmente en el área de microbiología, metabolismo y diversidad microbiana, fueron puestos en práctica para llevar a cabo los análisis microbiológicos de forma más rigurosa, precisa y rápida. Obteniendo así resultados confiables lo que se traduce en la demostración de la competencia técnica. Además, se resaltarán la importancia de las técnicas y prácticas aprendidas en los laboratorios, durante la formación académica, conocidas como buenas prácticas de laboratorio (BPM), en el manejo adecuado de los instrumentos, materiales, equipos, controles ambientales, patrones de referencia, etc., para lograr el aseguramiento de la validez de los resultados.

### **3.1. Conceptos previos**

#### 3.1.1. Inocuidad alimentaria

En la Ley de inocuidad de alimentos (2008) se define la inocuidad de los alimentos como la garantía de que los alimentos, cuando se preparen y/o consuman, no causarán daño alguno al consumidor. Así mismo, en la Resolución ministerial N° 591 – 2008/MINSA (MINSA, 2008) se indica la calidad sanitaria como el conjunto de requisitos microbiológicos, físico-químicos, y organolépticos necesarios de un alimento que lo hace apto para consumo humano. Además, se definen a los criterios microbiológicos como “la aceptabilidad de un producto o un lote de alimento basada en la ausencia o presencia, o en la cantidad de microorganismos, por unidad de masa, volumen superficie o lote” (p. 2).

#### 3.1.2. Microorganismos indicadores

Son un grupo de microorganismos, que son fácilmente enumerados y cuya presencia en los alimentos (cuando superan los límites) indican una exposición a condiciones que permiten el ingreso y proliferación de organismos peligrosos. Por tanto, estos microorganismos se utilizan para evaluar la seguridad que ofrecen los alimentos en cuanto a la calidad microbiológica. Los microorganismos indicadores más utilizados son: aerobios mesófilos, bacterias entéricas, enterococos, bacterias esporuladas, etc., (International Commission on Microbiological Specifications for Foods [ICMSF], 2000).

#### 3.1.3. Microbiología de los alimentos

Se encarga de estudiar la composición microbiana en los alimentos, para lo cual utiliza técnicas estandarizadas con la finalidad de detectar los microorganismos presentes. Algunos microorganismos poseen la capacidad de causar enfermedades cuando se incumplen las medidas de higiene, limpieza y desinfección, provocando que los alimentos sean potencialmente peligrosos. Es por esto que el principal objetivo de la conservación de alimentos es inactivar y controlar el crecimiento de microorganismos patógenos y de descomposición, asegurando alimentos saludables y estables en almacenamiento (ICMSF, 2000; Húngaro, et al., 2014; Antillón et al., 1997).

#### 3.1.4. Coliformes

El grupo de coliformes consiste en distintos géneros de bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Este grupo de bacterias tienen forma de bastoncillos y se les define

como anaeróbicos facultativos, Gram-negativos, no formadores de espora y con actividad  $\beta$ -galactosidasa (APHA-AWWA-WEF, 2017).

#### 3.1.5. Coliformes fecales o termotolerantes

Estas bacterias se definen como el grupo de organismos coliformes que pueden fermentar la lactosa entre 44 y 45 °C. Este grupo incluye géneros *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, y *Citrobacter* (Ríos Tobón et al., 2017). Los Coliformes fecales son microorganismos que se transmiten por medio de los excrementos. La *Escherichia* es un género de bacteria que se encuentra normalmente en la flora intestinal del hombre y en el de otros animales de sangre caliente. Hay diversas cepas de *Escherichia*; algunos no causan daño en condiciones normales y otros pueden incluso ocasionar la muerte (OMS, 1996).

#### 3.1.6. *Escherichia coli*

Es una enterobacteria anaerobio facultativa. Las *E.coli* enteropatógenicas (EPEC) son cada vez más frecuentes en infecciones gastrointestinales y en fiebres generalizadas. Algunas cepas, como la *E.coli* enterohemorrágica (EHEC), pueden causar esporádicamente epidemias de una grave enfermedad transmitida por consumir agua contaminada entre otros alimentos (Madigan, 2009).

Este microorganismo es utilizado como un indicador de contaminación fecal debido a que proviene del tracto intestinal del hombre y animales de sangre caliente. Una contaminación con *E.coli* en productos procesados indica que el tratamiento de calor no ha sido eficiente. La manera más correcta de identificar *E.coli* es a través de pruebas bioquímicas (Pacombia, 2017).

En cuanto a la contaminación del agua por este microorganismo se pueden aplicar las siguientes medidas de control: protección de las fuentes de agua no tratada contra los residuos humanos y animales, tratamiento suficiente y protección del agua durante su distribución. Los análisis convencionales de *E.coli* proporcionan un indicador adecuado de la presencia de serotipos enteropatógenos en el agua de consumo humano (OMS, 2018).

#### 3.1.7. Aerobios mesófilos

La numeración de los microorganismos aerobios mesófilos es uno de los indicadores microbiológicos más comúnmente utilizado. Es bastante útil ya que nos evidencia si la limpieza, desinfección, el control de la temperatura durante los procesos de tratamiento industrial, el transporte y almacenamiento han sido los adecuados. Además, podemos

obtener información acerca de una posible alteración incipiente de los alimentos, su vida útil y la falta de control de las temperaturas de refrigeración (ICMSF, 2000).

#### 3.1.8. *Listeria monocytogenes*

Este microorganismo infecta al ser humano a través de la ingesta de alimentos contaminados produciendo la enfermedad conocida como Listeriosis. Su ingesta puede resultar en síntomas leves; sin embargo, puede llegar a producir náuseas, dolor abdominal, fiebre, diarrea, etc., como si fuera una gastroenteritis genuina. Se sabe además que *L. monocytogenes* puede atravesar la barrera materno-fetal en mujeres embarazadas e infectar el sistema nervioso central, generando una de las meningitis bacterianas con mayor tasa de mortalidad (Dortet et al., 2009).

#### 3.1.9. *Salmonella*

*Salmonella* es el género de bacterias gram negativas que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y cuyas características es ser anaerobia facultativa, con forma de bacilo y no forma esporas. Su género tiene dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. Son los patógenos transmitidos por los alimentos más comunes, responsable de las infecciones zoonóticas en humanos, llamadas Salmonelosis. Por lo tanto, las infecciones por *Salmonella* son una gran preocupación para la salud pública y la industria alimentaria en todo el mundo (Mohammed, 2019; APHA-AWWA-WEF, 2017).

#### 3.1.10. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram-positiva, con forma esférica y agrupada en forma de racimos. Es causante de una amplia gama de enfermedades infecciosas, entre las que encontramos infecciones cutáneas, neumonía e intoxicación alimentaria (Gnanamani, 2017). Esta última raramente es mortal, aunque en algunos casos puede complicarse. Entre los síntomas comunes por la intoxicación de *S. aureus*, al comer un alimento contaminado, están: las náuseas, vómitos, diarrea, malestar y debilidad general (ICMSF, 2000).

#### 3.1.11. *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* es una bacteria Gram-positiva, con forma de bacilo, capaz de formar esporas y crece en condiciones de anaerobiosis. Su distribución va desde el medio ambiente hasta la microbiota de humanos y animales (Silveira et al., 2015). Esta especie es la de mayor producción de toxinas ocasionando intoxicación alimentaria al comer alimentos mal cocidos y almacenados. Su intoxicación es bastante común y se puede prevenir manteniendo la

temperatura adecuada para los alimentos, ya sea a altas o bajas temperaturas, así como un buen almacenamiento de los mismos (Hailegebreal, 2017).

#### 3.1.12. Patrón de referencia

Según el Vocabulario Internacional de Metrología [VIM] (2012), “Es el patrón designado para la calibración de otros patrones de magnitudes de la misma naturaleza, en una organización o lugar dado” (p. 74). Ejemplo de estas podemos tener a las pesas patrones para calibrar la balanza.

### **3.2. Competencia y Autorización del Analista**

Según la NTP ISO / IEC 17025:

El laboratorio debe asegurarse de que el personal tiene la competencia para realizar las actividades de laboratorio de las cuales es responsable y para evaluar la importancia de las desviaciones. Además, el laboratorio debe autorizar al personal para llevar a cabo actividades de laboratorio específicas. (pp. 8-9).

Esto genera que el analista debe pasar por un proceso de entrenamiento antes de recibir la autorización para desempeñar las actividades requeridas al análisis, reporte, aseguramiento de la validez de los resultados, etc. La figura 1 nos ofrece un esquema general del proceso de autorización del analista. El analista al ingresar como personal nuevo al laboratorio recibe entrenamiento en las distintas técnicas, instructivos y procedimientos que engloba lo referente al análisis microbiológico. Así mismo, recibe una inducción al sistema de gestión del laboratorio basada en la NTP ISO / IEC 17025. El entrenamiento del analista es supervisado hasta la evaluación de su competencia a través de ensayos y/o pruebas entre las que se encuentran muestras ciegas, muestras interlaboratorios e intralaboratorios, etc., que serán desarrolladas en la parte de aseguramiento de la validez de los resultados. Una vez se demuestre la competencia del analista recibe la autorización para realizar los ensayos respectivos, entre otras actividades. Finalmente se registra la fecha de autorización y se evalúa el desempeño del analista a través del tiempo.



**Figura 1.** Procedimiento de Entrenamiento, Evaluación y Autorización del Analista.

### 3.3. Análisis Microbiológico de Alimentos y Bebidas

El laboratorio de microbiología inició sus actividades a través del análisis microbiológico en alimentos y bebidas. Entre los productos con los que más trabaja se encuentran cereales, piensos, pre-mezclas, panaderías, frutas, harinas, hojuelas, alimentos para animales, etc. Los tipos de ensayo que realiza son controles, vida útil, análisis para registros y certificados sanitarios. Cada uno depende de lo solicitado por el cliente y de la entidad a la cual este desea presentar el informe de ensayo.

#### 3.3.1. Normativa

El laboratorio de microbiología trabaja en base a la normativa nacional, como la norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, aprobado mediante la RM N°591-2008/MINSA, en la cual se señalan los criterios microbiológicos que deben cumplir los alimentos y bebidas en estado natural, elaborados o procesados, para ser considerados aptos para el consumo humano; la norma sanitaria para la fabricación, elaboración y expendido de productos de panificación, galletería y pastelería RM N°1020-2010/MINSA; normas técnicas peruanas específicas como la de la quinua (NTP 205.062 2009), fichas técnicas de productos procesados, etc. También toma como referencia lo establecido en el Codex Alimentarius y la Association of Official Agricultural Chemists (AOAC).

### 3.3.2. Métodos acreditados

El laboratorio utiliza métodos normalizados emitidos por organismos reconocidos nacionales e internacionales, que proporcionan las bases para emitir dictámenes legales sobre calidad y seguridad microbiana de un alimento. Estos organismos son la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF), Organización internacional para la normalización (ISO), Bacteriological Analytical Manual (BAM) de la Food and Drug Administration (FDA), Métodos oficiales de análisis (OMA) de la Asociación de químicos analíticos oficiales (AOAC) y Normas técnicas peruanas (NTP).

La selección de estos métodos responde al tipo de organismo al cual se desea presentar el informe de ensayo, a la normativa establecida, y al tipo de producto. Un ejemplo de este último es la quinua. Este producto entra en la clasificación de granos secos según la RM N°591-2008/MINSA, cuyo único criterio microbiológico requerido es el recuento de mohos. Sin embargo, este criterio no es suficiente si se desea obtener certificados sanitarios requeridos para exportación y comercialización. Es por eso que para este último caso una mejor opción es utilizar la NTP 205.062 2009, específica para todas las variedades de quinua, donde encontramos que los requisitos microbiológicos exigidos son: recuento de mohos, recuento de aerobios mesófilos, recuento de coliformes, recuento de *Bacillus cereus* y detección de *Salmonella*.

Los métodos microbiológicos se pueden clasificar como: cualitativos, cuantitativos y semicuantitativos. Los métodos cualitativos se basan en la detección del microorganismo en estudio, en donde los dos únicos resultados son presencia y ausencia. El método cuantitativo se basa en cuantificar las unidades formadoras de colonias en una cantidad de muestra, realizando recuentos. Por último, los métodos semicuantitativos utilizan determinación estadística para estimar la concentración de un microorganismo en la muestra (Hoyos et al., 2018). Las tablas 1, 2 y 3 muestran los métodos acreditados con los que cuenta el laboratorio.

**Tabla 1.** Lista de Métodos Cualitativos Acreditados para el Análisis de Alimentos

Número	Método	Norma de referencia
1	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	AOAC 997.03, Capítulo 17
2	Detección de <i>Salmonella sp.</i>	ICMSF
3	Detección de <i>Vibrio cholerae</i>	FDA / BAM
4	Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	FDA / BAM

**FUENTE:** Información obtenida de la página web de INACAL.

**Tabla 2.** Lista de Métodos Cuantitativos Acreditados para el Análisis de Alimentos

Número	Método	Norma de Referencia
1	Microorganismos mesófilos aerobios viables a 30°C	ISO 4833-1, Part1
2	Recuento de enterobacterias	ISO 21528-2 Part 2
3	Recuento de heterotróficos	SMEWW-APHA-AWWA- WEF Part 9215 B
4	Recuento de mohos y levaduras	ICMSF
5	Recuento en placa de aerobios mesófilos	ICMSF
6	Recuento en placa de <i>Bacillus cereus</i>	ICMSF – FDA / BAM
7	Numeración de <i>Clostridium perfringes</i>	FDA / BAM

**FUENTE:** Información sacada de la página web de INACAL



**Tabla 3.** Lista de Métodos Semi-cuantitativos Acreditados para el Análisis de Alimentos

Número	Método	Norma de referencia
1	Coliformes (NMP)	ICMSF
2	Enumeración de <i>E. coli</i>	ICMSF
3	Numeración de <i>E. coli</i>	ISO 16649-3 Part 3
4	Recuento de organismos de origen fecal (NMP)	ICMSF
5	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> , coagulasa positiva (NMP)	ICMSF

**FUENTE:** Información obtenida de la página web de INACAL.

A continuación, se mostrará el ejemplo del análisis de una muestra de embutidos en donde se puso en práctica los conocimientos en técnicas microbiológicas, así como las buenas prácticas de laboratorio, con la finalidad de obtener resultados confiables, veraces y poder mantener el aseguramiento de la calidad.

Al tratarse de un trabajo monográfico el procedimiento de cada análisis no será detallado en su extensión sino de forma resumida.

### 3.3.3. Análisis microbiológico de una muestra de embutidos

Se ingresó una muestra de embutidos al laboratorio manteniendo todas las medidas correspondientes para su posterior análisis. La orden generada (Fig. 2), es entregada al analista en donde se encuentra toda la información requerida para el análisis. Los ensayos detallados en el análisis para este tipo de alimento se encuentran basado en los criterios microbiológicos establecidos por la RM N°591-2008/MINSA. En algunos casos la lista de ensayos puede variar dependiendo de lo requerido por el cliente o la entidad a la que se desea presentar el informe. En este último caso se puede seguir lo establecido por las fichas técnicas del producto o hacer una combinación de los criterios de diferentes normas.

En la figura 2 podemos ver el código con que se identifica la muestra (Orden de trabajo [O/T] o número de servicio [N/S]), una breve descripción del producto, características del producto, la identificación o marca del mismo y la lista de ensayos requeridos, cada una con su método de referencia.

Certifical		ORDEN DE TRABAJO		PR 16 Versión 03 Fecha: 2017-01-02
Fecha : 2018-07-31		O/T 04275.0718		N/S : 18013645
Presentación : Granel		Condición de Recepción : Tª Ambiente		Cantidad de Muestras : 1
DESCRIPCION DEL PRODUCTO (Producto Declarado por el cliente)				
1) EMBUTIDO (CHORIZO)				
Característica : Muestra proporcionada por el solicitante en			Identificación/Marca :	
1) bolsa de polietileno - 01 Bolsa 408 g y 01 Bolsa x 557 g -			1) DON ZACARIAS	
Clase Ensayo	ENSAYO / SERVICIO	Cantidad Ensayos	METODO ENSAYO / DESCRIPCION	
MB	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> - Muestras (1)	1	AOAC OFFICIAL METHOD 997.03 (2003). Detection of <i>Listeria monocytogenes</i> and Related <i>Listeria</i> spp. in Selected Foods and from Environmental Surfaces: Visual Immunoprecipitate Assay (VIP). Official Methods of Analysis Pág. 157-159	
MB	Enumeración de <i>Escherichia Coli</i> (NMP) - Muestras (1)	1	ICMSF Microorganismos de los Alimentos. Pág. 132-134, 136 (M1)-142. 2da Ed. Reimpresión 2000. Bacterias coliformes. Pruebas de identificación de organismos coliformes. IMVIC	
MB	Enumeración de <i>Staphylococcus Aureus</i> . Coagulasa Positiva - Muestras (1)	1	ICMSF. 2da Ed. Vol. 1, Método 5, Pág. 235-238. Reimpresión en el 2000, Editorial Activa.	
MB	Numeración de <i>Clostridium perfringens</i> - Muestras (1)	1	FDA/BIH Online 8th Ed. Rev. A/ 1996. January 2001. Chapter 16, Item C, D, E. <i>Clostridium perfringens</i> . Cultural methods for enumeration and identification of <i>Clostridium perfringens</i> in foods	
MB	Microorganismos Mesófilos Aerobios Viables a 30°C - Muestras (1)	1	ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony count technique at 30°C by the pour plate technique. 1ª Edición. 2013	
MB	Detección de <i>Salmonella</i> sp. - Muestras (1)	1	ICMSF Microorganismos de los Alimentos. Parte II. Métodos Recomendados para el Análisis Microbiológico de los Alimentos. Pruebas serológicas para la identificación de salmonelas I-II-II, pág. 165-178. 2da Ed. Reimpresión 2000. VALIDADO	

**Figura 2.** Orden de Trabajo con los Análisis Respective para la Muestra de Embutido  
**FUENTE:** Documento obtenido del sistema de órdenes del laboratorio de microbiología de la empresa CERTIFICAL S.A.C.

**Preparación de la muestra y medios.** Se prepara todo lo necesario para el análisis de la muestra, siendo una parte importante y muy crucial la preparación de los medios utilizados durante los ensayos.

Dentro de las normas de referencia se encuentran medios sugeridos para un óptimo desempeño del mismo por lo que su uso es una medida para asegurar resultados confiables. Dependiendo de la disponibilidad el laboratorio utiliza medios formulados comercialmente como preferencia, en caso no se encuentren disponibles se procede a prepararlos mediante mezcla de ingredientes. Los medios suelen ser específicos para el método a emplear lo que reduce una posible contaminación por microorganismos no deseados. Se debe registrar las características del medio para reconocer un deterioro de estos con el tiempo. Así mismo, deben hacerse pruebas para verificar su selectividad utilizando cepas patrones positivas y negativas. Finalmente, estos medios deben almacenarse en lugares apropiados, se debe verificar el pH de los medios a la hora de su preparación y deben esterilizarse, ya sea por autoclave o filtración, a las condiciones de temperatura y presión establecido por el fabricante.

Una vez preparados los medios estos deben mantenerse en baños de agua a una temperatura de 40-50°C. En caso se requiera agregar suplementos o antibióticos seguir lo establecido por el método o lo indicado por el fabricante.

En cuanto a la muestra, de encontrarse congelada se procede a descongelar a temperatura de refrigeración (2-5 °C) por no más de 5 horas. A la hora de procesar la muestra se deben utilizar materiales o utensilios estériles para mantener la asepsia y evitar una posible contaminación. Al tratarse de una muestra no líquida se procedió a preparar una suspensión homogénea. Ese se realizó utilizando homogeneizadores provistos de cuchillas cortantes que permiten la liberación, al diluyente, de los microorganismos que pueden estar aprisionados en el interior del alimento, en las superficies secas y/o gelatinosas. La cantidad de muestra pesada depende del método de referencia, por lo general se pesa una cantidad de muestra y se agrega el diluyente 9 veces el peso de la muestra. A partir de la suspensión homogénea se prepararon las diluciones necesarias que luego se utilizaron en los distintos métodos. Estas se prepararon utilizando 10 mL del homogeneizado con 90 mL de agua peptonada, hasta conseguir las diluciones necesarias. La figura 3 muestra los materiales para el procesamiento inicial de la muestra y para la preparación de la suspensión homogénea.



**Figura 3.** Material y Equipo Utilizado para el Procesamiento Inicial de la Muestra

**Análisis de los ensayos requeridos.** A continuación, se describirá brevemente los ensayos realizados en el análisis del alimento.

***Microorganismos mesófilos aerobios viables a 30°C.*** Método de tipo cuantitativo. Brevemente, luego de haber preparado el homogeneizado inicial y las diluciones correspondientes, tal y como se describe en la sección 1.3.3.1, se procedió a inocular 1 ml de todas las diluciones en placas por duplicado. Luego se utilizó la técnica de incorporación

en donde se agregó de 15 a 20 ml de agar Plate Count. Las placas fueron incubadas a  $30 \pm 1$  °C por  $48 \pm 3$  horas. Finalmente se realizó el recuento de colonias eligiendo la dilución con placas que contengan entre 30 – 300 colonias. El reporte de resultados se verá más adelante.

**Enumeración de *E.coli*.** La enumeración de *E.coli* pertenece a los métodos semicuantitativos. Por lo tanto, se utilizó la técnica del número más probable (NMP). Esta técnica estima la densidad media de microorganismos en una muestra. Brevemente, se inocularon 3 tubos por dilución con caldo de enriquecimiento Lauril sulfato triptosa y si incubaron a 35-37 °C durante 24 y 48 horas. Tubos con producción de gas y turbidez fueron elegidos como presuntivos, tomando una muestra de cada uno de ellos se inocularon tubos con caldo EC y se incubaron a  $44.5 \pm 0.2$  °C, en un baño de agua, durante 24 - 48 horas. Se seleccionaron los tubos con producción de gas y turbidez y se estriaron en agar selectivo eosina azul de metileno (EMB) para obtener colonias típicas de *E. coli*. Se tomaron colonias típicas aisladas, estas se estriaron en agar nutritivo para luego inocular los medios de las pruebas INVIC (Indol, rojo de metilo, Voges Proskauer y citrato sódico), y poder realizar la identificación bioquímica.

***Listeria monocytogenes*.** Este es un método de tipo cualitativo. Brevemente, el procedimiento tiene dos etapas, el primero es un tamizado rápido mediante el uso de anticuerpos con alta especificidad a los antígenos presentes en *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria sp*. La segunda etapa consiste en el aislamiento en agar selectivo y la confirmación de las colonias sospechosas de *Listeria monocytogenes* a través de las pruebas bioquímicas.

**Detección de *Salmonella sp*.** Método de tipo cualitativo. Brevemente, el análisis consistió en cuatro etapas: la etapa de pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo en medio líquido, enriquecimiento selectivo en medio sólido, identificación mediante pruebas bioquímicas y serológicas. Se reporta como presencia o ausencia al ser un método cualitativo.

**Recuento de *Staphylococcus aureus* (NMP).** Este método pertenece al tipo semicuantitativo. Brevemente, este análisis se inició usando un caldo selectivo para *S. aureus*, esto se hizo utilizando tres tubos por dilución. Se seleccionaron los tubos presuntivos y se estriaron placas con agar selectivo para evidenciar la producción de lecitinasa. Las colonias productoras de esta enzima se sometieron a la prueba de coagulasa para confirmarse como pertenecientes a *S. aureus*.

**Numeración de Clostridium perfringens.** Clasificado como método cuantitativo. Brevemente, este análisis consistió en inocular las diluciones preparadas en placas, por duplicado, con agar selectivo, que permitió obtener colonias con actividad de lecitinasa. La incubación se realizó en condiciones de anaerobiosis. Posteriormente se realizó la etapa de confirmación de las colonias presuntivas a través de las pruebas bioquímicas (coagulación de la leche, reducción de nitrato, licuefacción de la gelatina y fermentación de la lactosa).

En cada uno de los análisis se utilizó el material de referencia adecuado (cepas) para los controles positivos y negativos que permitirá la identificación del microorganismo en cuestión. De la misma manera se tuvieron controles de medio y/o ambientales para detectar contaminaciones que alteren los resultados. Todo lo referido al aseguramiento de la validez de los resultados se desarrollará más adelante. Finalmente, al no existir trabajos no conformes, se emitió el informe de ensayo como podemos ver en la figura 4. En este observamos los resultados obtenidos en el análisis de cada uno de los ensayos requeridos y sus unidades respectivas.

**INFORME DE ENSAYO MB N° 180811-028**

Emitido en Lima, el 11 de Agosto de 2018

Orden de Trabajo	: 04275 . 0718
Numero de Servicio	: 18013645
Nombre del Solicitante	: MENDIOLA BARBA ANDRES FELIPE
Dirección de la Empresa	: CALLE SANTA CARMEN N° 255 LIMA - LIMA - MIRAFLORES
Servicio Solicitado	: Informe de Ensayo Microbiológico.
Producto declarado	: EMBUTIDO (CHORIZO)
Cantidad de Muestra	: 01 Bolsa 498 g y 01 Bolsa x 557 g
Identificación / marca	: DON ZACARIAS
Presentación	: Envasado
Lugar y fecha de recepción	: Laboratorio Microbiológico. 31 de Julio de 2018
Características	: Muestra proporcionada por el solicitante en bolsa de polietileno.
Condiciones de recepción	: En aparente buen estado a temperatura de refrigeración.
Muestra de Diferencia	: No proporcionada por el Cliente
Fecha de inicio de Ensayos	: 31 de Julio de 2018
Fecha de término de Ensayos	: 11 de Agosto de 2018

**ENSAYOS**

DETERMINACIONES	UNIDADES	RESULTADOS
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	En 25 g	Ausente
Detección de <i>Salmonella</i> sp.	En 25 g	Ausente
Enumeración de <i>Escherichia Coli</i> (NMP)	NMP / g	20 x 10 <sup>3</sup>
Enumeración de <i>Staphylococcus Aureus</i> . Coagulasa Positiva	NMP / g	= 3
Microorganismos Mesófilos Aerobios Viables a 30°C	Microorganismos / g	1.6 x 10 <sup>7</sup>
Numeración de <i>Clostridium perfringens</i>	UFC / g	* < 10

**Figura 4.** Informe de Ensayo de la Muestra de Embutido  
**FUENTE:** Documento obtenido del sistema de informes del laboratorio de microbiología de la empresa CERTIFICAL S.A.C.

### **3.4. Análisis Microbiológico de Muestras de Agua**

#### 3.4.1. Normativa

Las normativas bajo las cuales trabaja y se rige el laboratorio para el análisis de muestras de agua son:

- *El* Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo humano D.S. N 031 2010 SA, en donde se establecen los criterios microbiológicos y parasitológicos para el agua de consumo humano.
- El Protocolo de Monitoreo de la Calidad de los Efluentes de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales, aprobada bajo la RM-273-2013-VIVIENDA, que establece un único criterio microbiológico para aguas residuales.
- Los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Aguas (ECA) D. S. N 004 2017 MINAM, que compila las disposiciones aprobadas mediante el Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM, el Decreto Supremo N° 023-2009-MINAM y el Decreto Supremo N° 015-2015-MINAM, en donde se establece categorías y parámetros físico-químicos, así como microbiológicos.
- La Directiva Sanitaria para la Determinación del Índice de Calificación Sanitaria de las Piscinas Públicas y Privadas de Uso Colectivo, Directiva Sanitaria N° 033 - MINSA/DIGESA - V.02.
- DS N° 003-2010-MINAM, Límites Máximos Permisibles para los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales

#### 3.4.2. Métodos acreditados

El laboratorio utiliza métodos normalizados establecidos en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, del organismo internacional APHA-AWWA-WEF, con la finalidad de lograr un análisis adecuado en la detección y cuantificación de los microorganismos establecidos en los criterios de las normativas mencionadas en la sección

3.4.1. La tabla 4 muestra los métodos acreditados con los que cuenta el laboratorio.

**Tabla 4.** Métodos Acreditados para el Análisis Microbiológico de Aguas

Número	Método	Norma de Referencia (SMEWW- APHA-AWWA-WEF)
1	Numeración de coliformes fecales (NMP)	Parte 9221 B (2) y 9221 E (1), 23rd Ed.
2	Numeración de coliformes totales (NMP)	Part 9221 B (2-3), 23rd Ed.
3	Numeración de <i>E.coli</i> (NMP)	Parte 9221 B (2), 9221 E (1), 9221 G2. 23rd Ed
4	Recuento de Heterotróficos	Parte 9215 B. 23rd Ed
5	Detección de Salmonella*	Parte 9260 B, (item 2.d), 23rd Ed
6	Detección de <i>Vibrio cholerae</i> *	Part 9260 H - items 1, 2, 3 d (1.a, 1.b), 6, 7, 23rd Ed
7	Numeración de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NMP)*	Part 9213 F, 23rd Ed.
8	Numeración de <i>Streptococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus</i> por NMP*	Part 9230 B (Errata 2013-03- 22), 23rd Ed.
9	Recuento de coliformes fecales por filtración de membrana*	Part 9222 D, 23rd Ed.
10	Recuento de coliformes totales por filtración de membrana*	Part 9222 B, 23rd Ed.
11	Recuento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por filtración de membrana*	Part 9213 E, 23rd Ed.
12	Recuento de <i>Streptococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus</i> por filtración de membrana	Part 9230 C (item 3.c.), 23rd Ed.

**FUENTE:** Información obtenida de la página web de INACAL.

\* Métodos que fueron acreditados posteriormente.

A continuación, se mostrará el ejemplo del análisis de una muestra de agua residual. De la misma forma que en el análisis de alimentos, el procedimiento de cada uno de estos no será detallado en su extensión sino de forma resumida.

### 3.4.3. Análisis microbiológico de una muestra de agua residual

Ingresó al laboratorio una muestra de agua residual (PTAR). Las aguas residuales según la NTP 214.042 (2012), “Son aquellas aguas (afluentes, efluentes y vertimiento) cuyas características originales han sido modificadas por actividades antropogénicas.” Teniendo además como tipos de agua dentro de esta clasificación a las aguas residual doméstica, industrial y municipal según su origen. Por tanto, se trabajó en base al DS N° 003-2010-MINAM, Límites Máximos Permisibles para los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales, donde se establecen los criterios físico-químicos y microbiológicos para este tipo de matriz. La numeración de coliformes termotolerantes es el único criterio microbiológico requerido. En la figura 5 podemos ver la orden de trabajo que fue generada para el análisis de la muestra de agua residual. En este podemos ver el código de identificación de la muestra (O/T y N/S), la descripción del producto, las características que tiene y la lista de ensayos con sus respectivos métodos de referencia.

ORDEN DE TRABAJO		N° de Orden de Trabajo: 0118 Fecha: 2018-01-26	
Fecha: 2018-01-26	O/T 00506.0118	N/S: 18010287	
Presentación: Granal	Condición de Recepción: Tª Refrigeración	Cantidad de Muestras: 1	
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO (Producto Declarado por el cliente) (AGUA RESIDUAL (INDUSTRIAL))			
Característica: Muestra(s) tomada(s) por personal de "CERTIFICAL" en la planta del solicitante.		Identificación/Marca:	
1) frasco de vidrio estéril con tapa rosca y boquilla de plástico de primer uso - MB: 01 Frasco x 0.5 L, PQ: 02 Frascos amber x 1.0 L cil, 02 Botellas x 1.0 L cil y 01 Botella x 0.5 L. - Lit: 8670458, Log: 0267		1) PTAR	
Clas. Ensayo	ENSAYO / SERVICIO	Cantidad Ensayos	METODO ENSAYO / DESCRIPCION
FQ	Aceites y Grasas - Muestras (1)	1	EPA METHOD 1661, REVISION B, 2012. N-HEXANE EXTRACTABLE MATERIAL (HEM, OIL AND GREASE) AND SILICA-GEL TREATED N-HEXANE EXTRACTABLE MATERIAL (SOT-HEM, NON-POLAR MATERIAL) BY EXTRACTION AND GRAVIMETRY
FQ	Demanda bioquímica de oxígeno (DBO5) - Muestras (1)	1	SM921-APHA-AWWA-WEF PART 5210 B, 22ND ED. 2012. BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND (BOD) 5-DAY BOD TEST.
FQ	Sólidos suspendidos totales - Muestras (1)	1	SM921-APHA-AWWA-WEF PART 2540 D, 22ND ED. 2012. SOLIDS, TOTAL SUSPENDED SOLIDS DRIED AT 103-105 °C
FQ	Demanda Química de oxígeno (DQO) - Muestras (1)	1	SM921-APHA-AWWA-WEF PART 5220 D, 22ND ED. 2012. CHEMICAL OXYGEN DEMAND (COD), CLOSED REFLUX, COLORIMETRIC METHOD
FQ	Temperatura (Campo) - Muestras (1)	1	SM921-APHA-AWWA-WEF Part 2550 B, 22nd Ed. Temperature, Laboratory and Field Methods, 2012
FQ	pH (Campo) - Muestras (1)	1	SM921-APHA-AWWA-WEF Part 4000-H+ B, 22nd Ed. pH Value, Electrode Method, 2012
MB	Numeración de Coliformes Termotolerantes (1)	1	SM921-APHA-AWWA-WEF Part 5221 B (2) y 5221 E (1), 22nd Ed. 2012. Multiple-Tube Fermentation Technique for Members of the Coliform Group, Standard Total Coliform Fermentation Technique, Fecal Coliform Procedure, Thermotolerant Coliform Test (EC Medium)

**Figura 5.** Orden de Trabajo para la Muestra de Agua Residual (Industrial)

**FUENTE:** Documento obtenido del sistema de órdenes del laboratorio de microbiología de la empresa CERTIFICAL S.A.C.

**Preparación de la muestra y medios.** La preparación de los medios es similar a lo indicado anteriormente para el análisis del embutido. La muestra ingresada se conservó a una temperatura de 2-5°C hasta su análisis. Antes de procesar la muestra se desinfectó la tapa del envase con alcohol al 70%, luego se determinó la concentración del cloro residual y se



agregó 0.1 ml de una solución de tiosulfato de sodio al 10 % por cada 100 ml de muestra, para neutralizar el cloro.

**Análisis de ensayos requeridos.** A continuación, se describe brevemente los ensayos realizados para el análisis del agua.

**Coliformes termotolerantes.** La normativa establece que la unidad de reporte para este parámetro es NMP/100 ml, por lo que se trata de un método semi-cuantitativo. La norma de referencia utilizada fue SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 9221 B (2) y 9221 E (1). 22nd Ed. 2012.

Brevemente, al tratarse de un método de tubo múltiple se inoculan tubos con caldo selectivo haciendo las diluciones correspondientes dependiendo de la carga microbiana de la muestra, en donde cada dilución consta de una batería de 5 tubos. Los tubos presuntivos (producción de gas y turbidez) fueron llevados a otro caldo selectivo para coliformes termotolerantes e incubados en baño de agua a una temperatura que permita el crecimiento de este grupo de microorganismos. Finalmente se consideran positivos los tubos con turbidez y producción de gas. La figura 6 nos muestra el informe de resultados para la muestra analizada en el que podemos observar una breve descripción del producto y el resultado obtenido en la enumeración de coliformes termotolerantes. El valor del resultado es obtenido de la tabla 9221: IV (Anexo 1) del SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 9221 C, esta tabla se utiliza cuando se utiliza series de 5 tubos por dilución. En el Anexo 2 se encuentra la tabla 9221: III, que se utiliza cuando se trabaja con volúmenes de inoculación de 10 ml usando 10 tubos.

**INFORME DE ENSAYO MB N° 180130-032**

Código del Cliente				E-1
Descripción del Punto				-
Código de Laboratorio				18010287(1)
Tipo de Producto				AGUA RESIDUAL (INDUSTRIAL)
Fecha de muestreo				28/01/18
Hora de muestreo				11:00 A.M
<b>ENSAYOS</b>	<b>UNIDAD</b>	<b>L.D.</b>	<b>L.C.</b>	<b>RESULTADOS</b>
Enumeración de Coliformes Termotolerantes	NMP / 100 ml	1.0	1.0	49 x 10 <sup>1</sup>

(\*) Los métodos indicados no han sido acreditados por INACAL-DA

**Figura 6.** Informe de Ensayo de la Muestra de Agua Residual (Industrial)

**FUENTE:** Documento obtenido del sistema de informes del laboratorio de microbiología de la empresa CERTIFICAR S.A.C.

### 3.5. Aseguramiento de la Validez de los Resultados

El aseguramiento de la validez de los resultados consiste en aplicar todas las medidas, consideraciones y procedimientos necesarios para mantener la capacidad de generar resultados válidos y evitar que se obtengan resultados no conformes. El principal responsable de mantener el aseguramiento de la validez de los resultados es el analista ya que este debe demostrar su competencia antes, durante y después de los análisis de los ensayos para los cuales se encuentra autorizado. La cláusula 7.7.1 de la NTP-ISO/IEC 17015, establece que el laboratorio debe contar con un procedimiento para hacer el seguimiento de la validez de los resultados. Este seguimiento se debe planificar, revisar y debe incluir lo siguiente:

- a) *Uso de* materiales de referencia o materiales de control de calidad
- b) Uso de instrumentos alternativos que han sido calibrados para obtener resultados trazables
- c) Comprobaciones funcionales del equipamiento de ensayo y de medición
- d) Uso de patrones de verificación o patrones de trabajo con gráficos de control, cuando sea aplicable
- e) Comprobaciones intermedias en los equipos de medición
- f) Repetición del ensayo o calibración utilizando los mismos métodos o métodos diferentes
- g) Reensayo o recalibración de los ítems conservados
- h) Correlación de resultados para diferentes características de un ítem
- i) Revisión de los resultados informados
- j) Comparaciones intralaboratorio;
- k) Ensayos de muestras ciegas.

Los ítems b, c y g no aplican para métodos de ensayos microbiológicos.

El laboratorio de microbiología cuenta con el procedimiento PR-104 “Aseguramiento de la validez de los resultados”, en donde se detallan cada uno de estos ítems antes mencionados y la forma en que el laboratorio cumple dichos ítems. Los análisis de la muestra de embutidos y agua residual, servirán como ejemplo para evaluar el aseguramiento de la validez de los resultados.

En esta sección se demostrará la competencia técnica, así como la aplicación de los conocimientos teóricos y prácticos aprendidos durante la formación académica que servirán para obtener resultados confiables y veraces, siendo el analista el principal responsable en conocer y aplicar las pautas indicadas para el aseguramiento de la validez de los resultados.

### 3.5.1. Uso de materiales de referencia

El material de referencia microbiológico es utilizado para los controles positivos y negativos requeridos en los ensayos, que sirven para comparar y/o contrastar los resultados esperados con los obtenidos. El laboratorio cuenta con el instructivo IN-106 “Preparación, almacenamiento y uso de materiales de referencia microbiológico”, en donde se establece que el analista tiene la responsabilidad del mantenimiento, conservación, recuperación y control de calidad de las cepas de referencia utilizadas en el laboratorio. La reactivación de cepas, mensualmente, conlleva a la confirmación de las mismas a través de sus pruebas bioquímicas.

En la tabla 5 se listan las cepas utilizadas como material de referencia, para los controles positivos y negativos, en el análisis del embutido y el agua residual. La lista completa del material de referencia microbiológico se puede ver en el Anexo 3.

**Tabla 5.** Material de Referencia Microbiológico Utilizado

Cepas	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis ( <i>grupo D</i> )	ATCC® 13076
<i>Enterobacter aerogenes</i> ( <i>Klebsiella aerogenes</i> )	ATCC® 13048
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ATCC® 25923
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC® 13124
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 29212
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 19115
<i>Listeria innocua</i> (serotype 6a)	ATCC® 33090

### 3.5.2. Uso de patrones de verificación y comprobaciones intermedias en los equipos de medición

Según el Vocabulario Internacional de Metrología [VIM] (2012), la verificación es “La aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados” (p. 50). Los patrones de verificación son utilizados para garantizar que un equipo de medición se encuentra en condiciones de cumplimiento de los requisitos relacionados con su utilización propuesta. No debe confundirse la verificación con la calibración. El laboratorio cuenta con el instructivo IN-02 “Patrones de referencia”, en donde se establece que el analista tiene la responsabilidad del mantenimiento, conservación y uso de los patrones de referencia en el laboratorio. Así mismo, el instructivo IN-07 “Verificación de equipos”, establece que el analista es el responsable de realizar las verificaciones intermedias de los equipos de medición.

El laboratorio cuenta con patrones de referencia para realizar verificaciones rutinarias e intermedias de equipos, tales como incubadoras, balanzas, potenciómetro, congeladoras, etc. La figura 7 muestra la verificación diaria de la balanza utilizando pesas patrón.

Para los análisis del embutido y el agua residual se realizaron las verificaciones siguientes: uso de pesas patrones para una verificación rutinaria de la balanza, la lectura de la temperatura en pantalla para verificar la temperatura dentro de las incubadoras y baño de agua, y el uso de buffers patrón para realizar la verificación rutinaria del potenciómetro. La tabla 6 muestra la lista de equipos de medición con sus respectivas especificaciones para las verificaciones rutinarias e intermedias.



**Figura 7.** Verificación de la Balanza Mediante el Uso de Pesas Patrón

**Tabla 6.** Verificación de Equipos de Medición

Equipo	Verificación rutinaria	Verificación intermedia
Balanzas de Precisión	Diario: 2 ó 3 masas	-----
Balanza Analítica	Diario: 6 pesas	-----
Incubadoras	Diario: Temperatura marcada por el equipo	A mitad del periodo de calibración
Baño María	Diario: Temperatura marcada por el equipo	A mitad del periodo de calibración
Autoclave	Cinta Indicador Químico e Indicador Biológico: 3 Buffer en el día y 1 verificación	A mitad del periodo de calibración
Potenciómetro	1 Buffer y 1 solución de Conductividad el día que se use	-----
Multiparámetro	Cinta Indicador Químico e Indicador Biológico	A mitad del periodo de calibración
Estufa Esterilizadora	Diario: Temperatura marcada por el equipo	A mitad del periodo de calibración

### 3.5.3. Repetibilidad de los ensayos

También llamado repetibilidad y tiene como fundamento o finalidad verificar la precisión en la ejecución del método. El concepto de repetibilidad se encuentra definido en el capítulo de validación. El criterio de aceptación es que no existan diferencias significativas entre una ejecución y su réplica, ya sea para muestras replicadas o repetibilidad del ensayo. Se realiza el cálculo de la veracidad y la precisión del ensayo usando pruebas estadísticas tales como distribución de Poisson y diferencia relativa.

Se determina el criterio de aceptación para la precisión y si se supera el límite entonces se concluye que la variabilidad de los analistas es excesiva. Se determinará si es aceptable un aumento de la imprecisión; de no ser así, se desestimarán todos los resultados analíticos obtenidos desde la última comprobación de la precisión. Se identificará y resolverá el problema antes de seguir haciendo análisis. Los documentos donde se determina la

repetibilidad de los ensayos son de carácter confidencial de la empresa por lo tanto no se muestran en esta monografía.

#### 3.5.4. Correlación de resultados para diferentes características de un ítem

Este control consiste en verificar la conservación del grado de relación entre diferentes resultados que caracterizan a un mismo ítem. En otras palabras, debe existir cierta relación o concordancia entre los resultados de ensayos que se relacionan. Como ejemplo tenemos que el recuento de aerobios mesófilos debe ser mayor a un recuento de coliformes ya que los aerobios mesófilos abarcan todos los microorganismos que crecen entre 20 y 45°C; mientras que los coliformes crecen, de forma óptima, a una temperatura cercana a 35°C. Otro ejemplo es el de coliformes totales, coliformes termotolerantes y *E. coli*, siendo que los primeros deben encontrarse en mayor proporción que el último, ya que no todos los coliformes totales o termotolerantes pertenecen a la especie *E.coli*.

En el caso del informe de ensayo del embutido (Fig. 6) podemos ver que los microorganismos aerobios mesófilos se encuentran hasta una dilución de  $10^{-7}$ , mientras que *E.coli* se encuentra solo hasta la dilución  $10^{-3}$ . Por tanto, podemos decir que existe una correlación entre los resultados.

#### 3.5.5. Revisión de los resultados informados

Consiste en la verificación de la transcripción que hace el analista de los resultados, incluyendo las unidades correctas, al informe de ensayo. El analista durante las lecturas de los recuentos, número más probable o interpretación de las pruebas bioquímicas transfiere los resultados a un formato específico; este formato luego es utilizado para emitir el informe correspondiente. Las figuras 8 y 9 muestran las lecturas de métodos cuantitativos para aerobios y coliformes, respectivamente.



**Figura 8.** Recuento de Aerobios Mesófilos en Placas de Agar Plate Count.



**Figura 9.** Recuento de Coliformes en Placa con Agar Violeta Rojo y Bilis (VRBA)

### 3.5.6. Comparaciones intralaboratorio

Según la NTP ISO/IEC 17025 (2017), “Es la organización, realización y evaluación de mediciones o ensayos sobre el mismo ítem o ítems similares, dentro del mismo laboratorio de acuerdo con condiciones predeterminadas.” Las comparaciones intralaboratorio, también llamada reproducibilidad, consiste en verificar la precisión de la ejecución del método entre analistas del laboratorio. La definición exacta de reproducibilidad se encuentra en el capítulo de validación. Se comparan los resultados del analista con los resultados obtenidos por el analista de mayor experiencia. De no existir diferencias significativas entre una ejecución y su réplica se puede decir que el método o ensayo es reproducible. Las comparaciones

intralaboratorio son de carácter confidencial para la empresa por lo que no se muestran en esta monografía.

### 3.5.7. Muestras ciegas

Las muestras ciegas son muestras cuyo valor es desconocido por el analista en el momento de realizar el análisis. Estas muestras permiten verificar la veracidad de la ejecución del método. Se le entrega al analista muestras con un inóculo conocido, ya sea para una prueba cuantitativa, cualitativa o semicuantitativa y se evalúa la capacidad del analista para encontrar resultados repetibles y veraces; es decir, cercanos al valor verdadero. Estas muestras ciegas son entregadas al analista con una frecuencia establecida por el jefe del laboratorio. Los resultados de estas muestras son de carácter confidencial para la empresa por lo que no se muestran en esta monografía.

Otra forma también de darle seguimiento al aseguramiento de la validez de los resultados es a través de las pruebas de aptitud o pruebas interlaboratorio. Estos se encuentran desarrollados en el siguiente capítulo por lo que aquí solo se mencionan como parte del seguimiento.

Como conclusión, es responsabilidad del analista mantener el aseguramiento de la validez de los resultados ya que es el principal ejecutor de los ítems antes mencionados en donde demuestra sus conocimientos obtenidos durante la formación académica, a través de su competencia técnica.



## **IV. ACREDITACIÓN DE NUEVOS MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS**

La empresa CERTIFICAL S.A.C., a través de su laboratorio de microbiología, decide expandirse hacia el sector ambiental aumentando el alcance de sus ensayos, ya que hasta ese momento solo se contaba con métodos acreditados para el análisis de alimentos y bebidas. El único método acreditado que tenía el laboratorio para el análisis de aguas era el de enumeración de coliformes y *E.coli* a través de la técnica de tubos múltiples (NMP). En el año 2017 se publica el Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM, en donde se establecen los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua. Aquí se establecen las categorías de los distintos tipos de agua a su vez que listan los criterios microbiológicos y parasitológicos para cada una de ellas. Por otro lado, en el Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo humano DS N° 031-2010-SA, se especifican las unidades (ufc / ml) en que deben ser reportados los resultados para los criterios establecidos.

Todo esto obligó al laboratorio a contar con nuevos métodos acreditados para poder analizar todos los criterios establecidos en el ECA, en el DS N 031 2010 SA y otras normativas.

### **4.1. Conceptos Previos**

#### **4.1.1. Acreditación**

Es la declaración de tercera parte relativa a un organismo de evaluación de la conformidad (organismo de certificación, inspección, laboratorios de ensayo y/o calibración) de que se cumplen los requisitos especificados manifestando la demostración formal de su competencia para llevar a cabo sus tareas específicas de la conformidad (NTP-ISO/IEC 17000, 2005).

#### **4.1.2. Calidad del agua**

En el DS N° 031- 2010-SA, (MINSAs, 2011) se indica que la calidad del agua se define como el cumplimiento de los límites máximos permisibles para los parámetros microbiológicos y parasitológicos, organolépticos, químicos y radioactivos. Además, la NTP 214.042 (2012),

establece al agua de uso y consumo humano como aquella que cumple con los requisitos físicos, químicos y microbiológicos.

#### 4.1.3. Organismo de Evaluación de la Conformidad (OEC)

Es el organismo que realiza servicios de evaluación de la conformidad. Estos servicios pueden ser de ensayo, calibración, inspección, certificación, validación y verificación; cuya clasificación puede ser de primera, segunda o tercera parte. Si el producto, proceso, servicio o instalación a ser evaluado pertenece al organismo entonces estamos hablando de un OEC de primera parte; si es adquirido, es de segunda parte; y si es independiente entonces estamos a un OEC de tercera (DA-ACR-01R).

#### 4.1.4. Testificación

Según ISO/IEC 17011 (2017), “Es la observación por parte del INACAL-DA de un organismo de evaluación de la conformidad que realice actividades de evaluación de la conformidad en su alcance de acreditación”

#### 4.1.5. Competencia técnica

Según ISO 9000 (2015), “Es la capacidad para aplicar conocimientos y habilidades con el fin de lograr los resultados previstos” (p. 29).

#### 4.1.6. Veracidad

Es el grado de aproximación entre el valor medio obtenido de una larga serie de resultados del ensayo y un valor aceptado como referencia. (ISO 5725-1).

#### 4.1.7. Precisión

Es el grado de concordancia existente entre los resultados independientes de un ensayo, obtenidos en condiciones estipuladas. (ISO 5725-1).

#### 4.1.8. Incertidumbre

Según ISO 3534-1 (2013), “Es el estimado aplicado a un resultado de un ensayo, que caracteriza el rango de valores dentro de los cuales se dice que se encuentra el valor verdadero.”

## **4.2. Procedimiento General de Acreditación**

El proceso de acreditación se puede resumir en seis partes, tal y como se puede observar en la figura 10. La presentación y revisión de la solicitud, la evaluación documentaria, la decisión de comité permanente de acreditación y el seguimiento de la acreditación son partes que corresponden a la gestión del laboratorio e involucran netamente a la dirección de acreditación de INACAL, al comité evaluador y a la jefatura del laboratorio. Por tal motivo, estas partes no se desarrollarán en la monografía.

El cuarto paso, evaluación de campo, involucra la revisión de documentos, entre los cuales se encuentran los resultados satisfactorios de la participación en pruebas de comparación interlaboratorio o pruebas de aptitud y las testificaciones. En esta última el equipo evaluador estará presente durante el desarrollo de los métodos de ensayo con el fin de comprobar la correcta aplicación de los procedimientos, así como la evaluación de la competencia técnica del personal (Procedimiento General de Acreditación [DA-acr-01P]).

Por otro lado, antes de presentar la solicitud para la acreditación es necesario que el laboratorio cuente con experiencia previa en la realización de las actividades que solicita acreditar. El laboratorio de microbiología, previamente realizó la implementación de los métodos que busca acreditar. Como parte de la implementación el laboratorio generó la competencia técnica requerida para iniciar el proceso de acreditación, así como la aprobación satisfactoria de las pruebas de aptitud, que serán revisadas posteriormente en la evaluación de campo.

En consecuencia, en este capítulo se desarrollará lo referente a la parte en donde participó el analista, a través de sus funciones, durante la implementación de los métodos y las testificaciones.



**Figura 10.** Procedimiento para la Acreditación Establecido por INACAL.  
**FUENTE:** Figura obtenida de la página web de INACAL.

### 4.3. Implementación

El proceso general de implementación empieza con la selección de los métodos (normalizado o validado) adecuados para la matriz o matrices a aplicar, que se desean incorporar al laboratorio y posteriormente acreditar. Luego se hace una revisión y evaluación del cumplimiento de los requerimientos establecidos por el método, tales como: analistas competentes, equipos calibrados, verificados y mantenidos, insumos de acuerdo a lo especificado, condiciones ambientales de trabajo idóneo, etc.

#### 4.3.1. Revisión de normativa y selección de métodos

Como se mencionó anteriormente, la selección de métodos que se desean acreditar responde a las exigencias de las normativas (ECA y DS N 031 2010 SA) y al alcance que el laboratorio establezca. Para esta acreditación se utilizaron métodos normalizados pertenecientes a Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, emitidos por APHA-AWWA-WEF.

A partir de este se elaboraron los procedimientos para cada método con el fin de establecer los requisitos necesarios de los mismos en cuanto a equipamiento, materiales, insumos, materiales de referencia, calibraciones, aseguramiento de la calidad, etc. Una vez elaborados

estos procedimientos se procedió a implementar lo necesario para lograr resultados válidos. En la tabla 7 se muestran los métodos a implementar con sus respectivos alcances.

**Tabla 7.** Lista de Métodos de Ensayo a Implementar

Número	Método de ensayo	Alcance
1	Detección de Salmonella	Agua para uso y consumo humano, Agua salina, Agua residual
2	Detección de <i>Vibrio cholerae</i>	Agua para uso y consumo humano, Agua de mar, Agua residual
3	Numeración de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NMP)	Agua para uso y consumo humano
4	Numeración de <i>Streptococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus</i> por NMP	Agua para uso y consumo humano, Agua de mar, Agua residual
5	Recuento de coliformes fecales por filtración de membrana	Agua para uso y consumo humano, Agua de mar, Agua residual
6	Recuento de coliformes totales por filtración de membrana	Agua para uso y consumo humano, Agua de mar, Agua residual
7	Recuento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por filtración de membrana	Agua para uso y consumo humano
8	Recuento de <i>Streptococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus</i> por filtración de membrana	Agua para uso y consumo humano, Agua salina, Agua residual

**FUENTE:** Información obtenida de la página web de INACAL

#### 4.3.2. Calibraciones de equipos, adquisición de material de referencia, insumos

Esta parte corresponde a la gestión del laboratorio y es función del jefe de área, en donde la participación del analista es casi nula, por lo que no se desarrollará en esta monografía; sin embargo, es necesario mencionarla como parte de la implementación.

El laboratorio contrató el servicio de calibración de la empresa METROIL para calibrar los equipos (baños de agua, incubadoras) a las temperaturas especificadas en cada uno de los métodos. Los certificados de calibración son conservados y revisados durante la etapa de evaluación de campo por el equipo evaluador. En el Anexo 4 y 5 podemos ver el certificado de calibración de una incubadora y un baño de agua, respectivamente. De la misma manera, se compraron los insumos necesarios y el material de referencia (cepas ATCC), especificadas en los métodos.

#### 4.3.3. Competencia técnica

Para la generación de la competencia técnica se ingresaron muestras al laboratorio de las distintas matrices en base al alcance de cada método. Estas muestras fueron inoculadas utilizando el material de referencia respectivo para cada análisis. Luego se calculó la precisión y veracidad para cada analista para evaluar si los resultados obtenidos son confiables y exactos. Si estos cumplen los criterios de aceptación entonces se autoriza al analista para la ejecución de todas las etapas, incluyendo la lectura de los resultados del método.

Como ejemplo, la tabla 8 muestra la competencia técnica para el método de recuento de coliformes totales por membrana filtrante. Al ser un método de recuento se utiliza la distribución de Poisson, para calcular la precisión. Esta distribución permite evaluar la competencia del analista para homogeneizar la muestra ensayada y para determinar errores en la ejecución del procedimiento. Observamos que para todos los productos el  $D^2$  es menor al valor tabular, por lo tanto, se concluye que todos los recuentos tienen una distribución de Poisson. Además, la veracidad, con un nivel de confianza al 95%, de todas las lecturas se encuentran dentro del intervalo de confianza calculado. Con esto se concluye que los resultados obtenidos por el analista son exactos, demostrando de esta forma su competencia técnica en el desarrollo del método. En el Anexo 6 podemos ver el archivo original de la competencia técnica para el recuento de coliformes totales por membrana filtrante para agua de uso y consumo humano. Las competencias técnicas de los demás métodos no se muestran en esta monografía por ser documentos de carácter confidencial de la empresa.

**Tabla 8.** Competencia Técnica para Recuento de Coliformes Totales por Membrana Filtrante.

Producto	Agua de uso y consumo humano			Agua residual		Agua salina
	Agua potable	Agua de mesa	Agua de piscina	Agua residual industrial	Agua residual doméstica	Agua de mar
Inóculo (ufc / 100 ml)	18	55	65	45	53	36
Dispersión Poisson D <sup>2</sup> (3.84*)	2.45	1.78	1.06	2.09	0.77	2.00
Veracidad (95 %)	Dentro del intervalo	Dentro del intervalo	Dentro del intervalo	Dentro del intervalo	Dentro del intervalo	Dentro del intervalo
ESTADO	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme

*Nota.* La dispersión de Poisson forma parte del parámetro de precisión.

\* Valor límite para la dispersión de Poisson.

#### 4.3.4. Incertidumbre

Luego de generar la competencia técnica y autorizar a los analistas para ejecutar todas las etapas del método se procedió a determinar la incertidumbre para los métodos. El cálculo de la incertidumbre se hizo de forma global; es decir, se calculó la incertidumbre a partir de los resultados obtenidos por todos los analistas. Como ejemplo podemos ver la tabla 9 donde se observan las fuentes de incertidumbre (Z, P, V y T) para este ensayo con sus respectivos valores para los 3 productos. También vemos las incertidumbres combinadas y expandidas calculadas a partir de las fuentes de incertidumbre. Para el cálculo de los límites se trabajó con el modelo de distribución de Poisson, obteniendo los límites al 95%. Los archivos originales no se muestran en esta monografía por ser documentos de carácter confidencial de la empresa.

**Tabla 9.** Incertidumbre para el Recuento de *Pseudomonas aeruginosa* por Filtración de Membrana

		Agua para uso y consumo humano		
Producto		Agua potable	Agua de mesa	Agua de piscina
	Z	0.1459	0.1459	0.1459
Fuentes de	P	0.0000	0.0000	0.0000
incertidumbre	V	0.0023	0.0023	0.0023
	T	0.0295	0.0304	0.0286
Incertidumbre	Combinada ( $U_c$ )	6.9948	7.0037	6.9868
	Expandida ( $U_{exp}$ )	13.9896	14.0074	13.9735
Límites al 95 %		[35 – 63] UFC / 100 ml		

*Nota.* Z: Dispersión natural de microorganismos; P: Proporción de confirmación; V: Volumen filtrado; T: Lectura por analistas

#### 4.3.5. Pruebas de aptitud

INACAL a través de la Directriz de Criterios para la Participación en Ensayos de Aptitud/Comparaciones Interlaboratorios (DA-acr-13D) establece que los laboratorios deben demostrar su competencia técnica a través de la ejecución de los análisis clínicos, ensayos o calibraciones, mediante la participación satisfactoria en programas de ensayos de aptitud. Además, los ensayos de aptitud permiten asegurar la validez de los resultados como parte de los requisitos de la norma NTP-ISO/IEC 17025 y NTP-ISO 15189 vigente.



En la DA-acr-13D se especifica que los laboratorios que solicitan por primera vez la acreditación, deben presentar los registros de su participación satisfactoria en por lo menos un ensayo de aptitud en cada disciplina, convirtiéndose entonces en un requisito indispensable para lograr la acreditación. Para este caso, se debe presentar los ensayos de aptitud para cada uno de los métodos con sus respectivos alcances.

También se establecen los criterios que deben cumplir los proveedores de las pruebas de aptitud/comparaciones interlaboratorios. Los organismos deben:

- Ser signatarios de MLA de IAAC o MRA de APAC o ILAC.
- Ser proveedores de pruebas de aptitud incluido en la European Proficiency Testing System (EPTIS).
- Ser acreditados con la Norma ISO/IEC 17043.

En las pruebas de aptitud se pone en práctica lo aprendido por el analista durante su formación académica y la competencia adquirida para obtener resultados que le permitan al laboratorio seguir con el proceso de la acreditación. Las pruebas de aptitud fueron correctamente desarrolladas obteniendo resultados sin diferencia significativa respecto a los valores de cada una de estas pruebas. Esto demostró la correcta aplicación de la metodología y la competencia técnica adquirida luego del entrenamiento. Los resultados de una de las pruebas de aptitud se encuentran en el Anexo 7. Al ser un documento de carácter confidencial de la empresa no se mostrarán los demás resultados de las pruebas de aptitud de estos métodos.

Una vez que el laboratorio obtuvo todos los registros y documentos que abarca la competencia técnica, la incertidumbre, las pruebas de aptitud, los certificados de calibración de los equipos, certificados de la compra del material de referencia (cepas), etc., solicitó la acreditación de los nuevos métodos a la dirección de acreditación de INACAL. Por tanto, se dio inicio al proceso de acreditación llegando hasta la parte de evaluación de campo.

#### **4.4. Testificaciones**

Como parte de la evaluación de campo el equipo o comité evaluador visitó las instalaciones del laboratorio, para la revisión de todos los documentos antes desarrollados y para realizar las testificaciones.

En estas testificaciones el equipo evaluador solicitó el ingreso de muestras pertenecientes a las matrices de los alcances de los métodos para presenciar el desarrollo y la correcta

aplicación de los procedimientos. La testificación consta dos partes, en la primera el auditor presencié la etapa inicial del procesamiento de la muestra que involucra la homogeneización, la inoculación a los medios, la incubación, etc., con el fin de hacer una evaluación de la destreza del analista a través de su conocimiento del método. La segunda parte consiste en la interpretación de los resultados a través de las pruebas bioquímicas, cuando sean necesarias. En esta última parte el auditor evaluó la correcta interpretación de los resultados y el reporte de los mismos, en base a lo exigido por las normativas. Así mismo, evaluó la habilidad que tiene el analista para responder ante resultados no conformes que se puedan presentar debido a la acción de distintos factores. Durante estas testificaciones el auditor no encontró algún hallazgo y observación, que puedan derivar en una no conformidad, tanto en la etapa inicial como en la interpretación de los resultados, lo que concluiría que el analista posee la competencia técnica para los métodos evaluados.

De darse el caso en que se obtengan resultados que deriven en trabajos no conformes se registrará en el formato respectivo. Luego se procederán a evaluar las causas y se tomarán las medidas adecuadas para evitar resultados no conformes en el futuro. Esta parte no será desarrollada en esta monografía por tratarse de temas más de gestión de documentos que microbiológicos.

Como ejemplo de la testificación se mostrará el procedimiento evaluado para el recuento de *Pseudomonas aeruginosa* por filtración de membrana.

#### 4.4.1. Recuento de *Pseudomonas aeruginosa* por filtración de membrana para una muestra de agua potable

El comité evaluador solicitó una muestra de agua potable inoculada con una suspensión de *Pseudomonas aeruginosa*, para evaluar el procesamiento de la muestra, el conocimiento del método, la confirmación y la interpretación de los resultados de dicha muestra. La orden de trabajo para la muestra de agua potable se encuentra en el Anexo.

Antes de la llegada el auditor se preparó todo el material y medios necesarios para el análisis. Se utilizó:

- Agar MPA
- Agar leche
- Equipo de filtración

- Bomba de vacío
- Membranas filtrantes con un tamaño de poro de 0.45 µm.
- Incubadora a 41.5 ± 0.5 °C y 35 ± 1.0 °C
- Baño de agua para mantener el agar de 40 – 45 °C
- Contador de colonias

El procedimiento completo se puede encontrar en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Brevemente se describirá la etapa inicial de la testificación. La muestra se homogenizó antes de iniciar el análisis. Luego se procedió a filtrar un volumen de 100 ml por tratarse de agua potable (en caso sea un tipo de agua que contenga material suspendido es preferible preparar diluciones). La filtración se realizó usando la membrana filtrante de 0.45 µm y la bomba de vacío. Una vez filtrada la muestra, usando una pinza estéril se procedió a colocar la membrana sobre una placa de 9 x 50 mm, que contenga agar MPA. Esta placa se incubó en forma invertida a 41.5 ± 0.5 °C por 72 horas.

Para la segunda etapa de la testificación, el auditor solicitó ver los resultados finales (confirmación). Para esto, se realizó el recuento de las colonias típicas en el agar MPA. Las colonias típicas son de forma plana con bordes claros y centros de color marrón a negro verdoso. El recuento se registró en el formato respectivo. Para la etapa de confirmación se tomaron al menos 5 colonias típicas, usando el asa de kohle se hace una estría, de 2 a 4 cm de largo, en el medio de una placa con agar leche. Finalmente, se incubaron las placas a 35 ± 1.0 °C por 24 horas. El auditor evaluó la correcta interpretación de la etapa de confirmación y el reporte de resultados. En la figura N podemos ver la etapa de confirmación, en agar leche, de una colonia típica de *P. aeruginosa*. Para interpretar este resultado se debe tener presente que *P. aeruginosa* hidroliza la caseína del agar leche produciendo el pigmento difusible verde amarillo que se observa en la figura 11. Para el reporte de resultados se calculó usando la siguiente fórmula.

$$P. aeruginosa / 100 ml = \# \text{ total de colonias} \times \frac{\# \text{ de colonias confirmadas}}{\# \text{ de colonias seleccionadas}}$$

Finalmente, el resultado final se reportó en el formato respectivo.



**Figura 11.** Confirmación de una Colonia Típica de *P. aeruginosa* en Agar Leche

## **V. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR HUEVOS DE HELMINTOS**

Otra de las problemáticas y desafío al que se enfrentó el laboratorio de microbiología de la empresa CERTIFICAL S.A.C., fue la pérdida de clientes y el gasto adicional en subcontrataciones, al no contar con métodos acreditados para los criterios parasitológicos establecidos en el Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo humano DS° N 031-2010-SA.

Por tal motivo la empresa estableció como objetivo la acreditación de un método que permitiera determinar huevos de helmintos de forma cualitativa y cuantitativa. El laboratorio decidió validar un método no normalizado, el mismo que posteriormente se buscaría acreditar. Esto conllevó a la implementación del laboratorio de parasitología como parte de dicha acreditación.

Durante el proceso de validación el analista puso en práctica su formación académica respecto a técnicas de microscopía, diversidad, estadística, buenas prácticas de laboratorio, etc. Estos permitieron obtener resultados válidos para lograr la determinación de todos los parámetros requeridos en el proceso de validación. Además, se debe resaltar la elaboración del procedimiento de Detección y Cuantificación de Huevos de Helmintos en Agua, como parte de las funciones desempeñadas por el analista, así como su participación en la elaboración del Informe de Validación.

Por tanto, en este capítulo se desarrollará el procedimiento de validación como parte de la contribución del analista al logro de dicho objetivo.

### **5.1. Conceptos Previos**

#### **5.1.1. Validación**

El concepto de validación según el Vocabulario Internacional de Metrología [VIM] (2012) es: “verificación de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto”. Además, según INACAL (2017): “la validación de métodos de ensayo establece que las

características técnicas de un método deben cumplir las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos”.

#### 5.1.2. Helmintos

La palabra “helminto” procede del griego y significa “gusano”. Incluye gusanos parásitos y de vida libre. Pueden tener forma y tamaños variados. Los principales gusanos parásitos se clasifican principalmente en el filo *Nematoda* (lombrices) y el filo *Platyhelminthes* (platelmintos, incluidos los trematodos y cestodos). (OMS, 2018). Además, poseen órganos diferenciados, y los ciclos de vida se alternan en huevos y larvas que pueden ser infecciosas o no (OMS, 2018; NMX-AA-113, 2012). *Ascaris lumbricoides* es considerado un organismo indicador para el estudio de huevos de helmintos a nivel ambiental, debido a que su índice de parasitismo a nivel mundial es muy alto y su fácil identificación (Nelson, 2003).

#### 5.1.3. Método de ensayo normalizado

Según la Directriz para la Validación de Métodos de Ensayo (DA-acr-20D) [2017], “Es aquel método de ensayo desarrollado por un Organismo de Normalización u otras organizaciones reconocidas nacional e internacionalmente, y que son aceptadas por el sector técnico involucrado” (p. 3).

#### 5.1.4. Método de ensayo no normalizado

Según DA-acr-20D (2017), “Es aquel método de ensayo desarrollado por el propio laboratorio u otras partes no reconocidas. Puede ser un método de ensayo normalizado modificado, ampliado o aplicado a un alcance diferente al original establecido en la norma.” (p. 3).

#### 5.1.5. Parámetros de validación

Son las características de validación que necesitan ser evaluadas y que generalmente son los siguientes: Exactitud, precisión, especificidad, selectividad, repetibilidad, reproducibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, linealidad y robustez (Sowjanya, et al., 2015). Las definiciones de estos parámetros se encuentran más adelante.

#### 5.1.6. Agua de bebida

Es el agua clasificada y destinada al uso y consumo humano, por tanto, puede ser consumida debido a que no representa un riesgo para la salud. Dentro de esta encontramos al agua potable, agua de mesa y agua envasada (NTP 214.042, 2012).

### 5.1.7. Agua de piscina

Agua clasificada y destinada al uso y consumo humano pero que debe ser sometida a diferentes tratamientos con el propósito de eliminar las bacterias, virus, hongos entre otros, que pueden encontrarse en ella (NTP 214.042, 2012).

## 5.2. Procedimiento de Validación

El Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo humano DS° N 031-2010-SA, establece los límites máximos permisibles para los parámetros microbiológicos y parasitológicos, entre los cuales encontramos huevos y larvas de helmintos, es por esto que el laboratorio decide contar con un método para detectar y/o cuantificar huevos de helmintos. En este proceso el laboratorio decide no utilizar un método normalizado debido a que los requerimientos de estos (equipos, reactivos, etc) son muy costosos. En su lugar opta por la opción de utilizar un método no normalizado y validarlo, con la finalidad que este permita obtener resultados confiables comparados con un método normalizado o de referencia de algún organismo internacional. La validación del método para detectar y/o cuantificar huevos de helmintos forma parte de la implementación del laboratorio de parasitología.

INACAL, a través de DA-acr-20D, nos brinda los criterios de validación con la finalidad de demostrar que un determinado método de ensayo, a las condiciones del laboratorio, tiene lo necesario para obtener resultados confiables y que cumple los fines para los cuales fue seleccionado. Dentro de esta directriz se sugiere el procedimiento general para lograr una validación del método adecuado. Este procedimiento, que se encuentra en la DA-acr-20D, consta de las siguientes etapas:

- a) Definir objetivo, campo de aplicación o alcance del método, documentos de referencia
- b) Definir los parámetros de validación y criterios de aceptación
- c) Desarrollar un procedimiento operacional de validación
- d) Definir los ensayos de validación
- e) Verificar si las características de operación de los equipos con los que cuenta el laboratorio son compatibles con las exigidas por el método en estudio
- f) Caracterizar los materiales
- g) Ejecutar las pruebas preliminares de validación

- h) Ajustar los parámetros de validación del método y los criterios de aceptación, si es necesario
- i) Ejecutar las pruebas completas de validación
- j) Preparar un procedimiento operacional para la ejecución del método de rutina
- k) Definir criterios de revalidación
- l) Definir tipo y frecuencia de verificación de control de calidad analítica del método de rutina
- m) Las pruebas y resultados deben ser documentados

El jefe de laboratorio, junto a un experto técnico, elabora el plan de validación en donde se establece el protocolo de validación para la detección y enumeración de huevos de helmintos, que se aplicará en muestras de agua envasada y agua de piscina por filtración de membrana. Este plan no será mostrado en esta monografía por ser de carácter confidencial. Nos enfocaremos en el desarrollo del proceso de validación y la obtención de los parámetros cualitativos y cuantitativos.

#### 5.2.1. Objetivo de la validación

El objetivo fue validar un método de ensayo para la determinación cualitativa (detección) y cuantitativa (enumeración) de huevos de helmintos en muestras de agua.

#### 5.2.2. Alcance del método

Se realizó en base al límite máximo permisible para huevos de helmintos establecido en el Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano. Posteriormente se revisó la NTP 214.042 (2012), donde encontramos la clasificación de la matriz agua para ensayos de laboratorio. Dentro del grupo de Aguas para uso y consumo humano se encuentran: Agua de bebida (Agua potable / Agua de Mesa / Agua Envasada), Agua de piscina y Agua de laguna artificial. De esta manera el alcance del método a validar fue consecuencia de lo establecido en la NTP 214.042, así como de la demanda por los clientes que en ese momento disponía el laboratorio. Para la finalidad de la validación y poder demostrar que el método cumple los fines para el cual fue seleccionado se optó por tomar dos tipos de agua: la muestra problema o crucial, aquella en donde existe mayor probabilidad de encontrar huevos de helmintos, y un tipo de agua en donde existe poca probabilidad de encontrar huevos de helmintos. Por tanto, se estableció que el alcance sería agua de piscina (de alta probabilidad) y agua envasada (de baja probabilidad).



El método se identificó de la siguiente manera:

- Detección de huevos de helmintos en muestras de agua envasada y agua de piscina.
- Enumeración de huevos de helmintos en muestras de agua envasada y agua de piscina.

### 5.2.3. Documentos de referencia

Se realizó la búsqueda de información necesaria para generar el procedimiento del método más adecuado a las condiciones del laboratorio (equipos, materiales, infraestructura, etc.). Por tal motivo, se debe tener en cuenta que el método elegido será propio del laboratorio. Finalmente, se revisaron las normativas con la finalidad de elegir el mejor procedimiento que permita obtener las unidades de medida establecidas en ellas. Una de las referencias utilizadas fue la tesis de Vásquez, Antonio (2011), donde se validó un método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras de hortalizas. Se modificó el método con la finalidad de adecuarlo a la disponibilidad de equipos y materiales del laboratorio; así como, al tipo de muestra analizada.

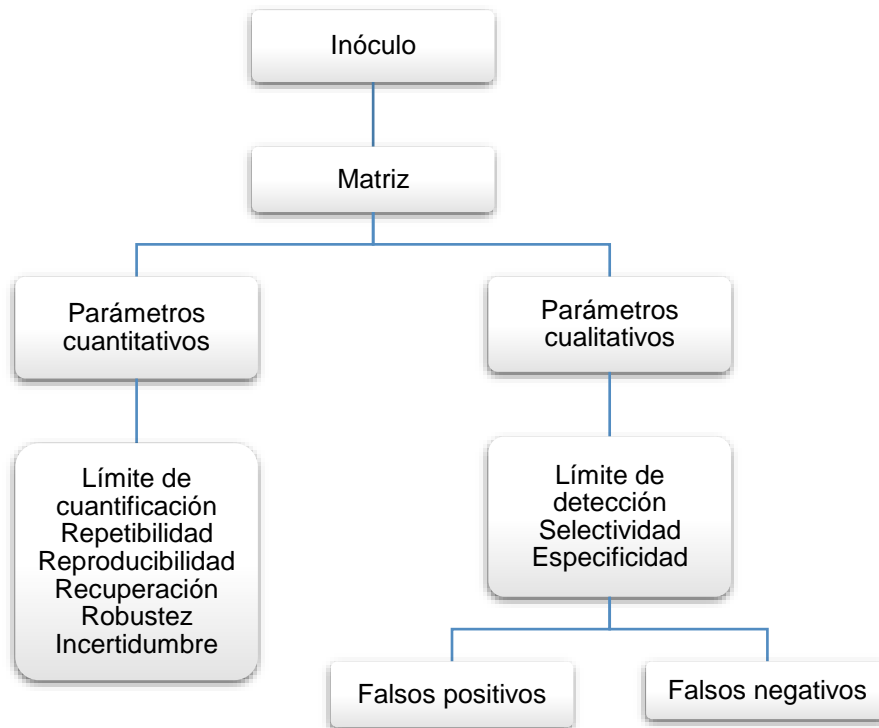
**Principio del método.** Luego de la búsqueda de información se estableció el principio del método. Este se basa en la concentración de los huevos de helmintos por filtración utilizando membranas con un diámetro de poro que permita retener los huevos de helmintos al ser estos de mayor diámetro. La identificación y cuantificación se realiza por observación directa en el microscopio óptico de campo claro.

### 5.2.4. Parámetros de validación y criterios de aceptación

La NTP ISO/IEC 17025 establece los requisitos generales y las características de desempeño que se deben cumplir para la validación de un método de ensayo. Sin embargo, en el Perú, es preciso trabajar con lo establecido por la INACAL en la directriz DA-acr-20D. Aquí también se habla de las características de desempeño que debe cumplir el método, pero se les conoce como parámetros de validación. La directriz brinda una serie de parámetros para métodos cuantitativos y cualitativos, siendo estos los siguientes: Veracidad, Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad), Selectividad, Rango, Linealidad, Límite de detección, Límite de cuantificación, Robustez, Sensibilidad e Incertidumbre.

Para el caso de la validación del método de enumeración de huevos de helmintos (cuantitativo) se tomaron en cuenta todos los parámetros especificados por la DA-acr-20D, a excepción de los parámetros Rango, Linealidad y Sensibilidad que son específicamente para métodos instrumentales. Mientras que para la detección de huevos de helmintos (cualitativo) se tomó en cuenta los parámetros: Límite de detección, Sensibilidad y Especificidad. Además, se agregaron los Falsos positivos y Falsos negativos.

En la figura 12 se muestra el esquema general de validación, para la obtención de los parámetros de validación. Este se inicia con la preparación del inóculo para contaminar de forma artificial la o las matrices de trabajo, se procesan las muestras y se realiza la lectura de estas. Finalmente, a partir de los resultados obtenidos se procede a determinar los parámetros cualitativos y cuantitativos.



**Figura 12.** Esquema para el Proceso de Determinación de los Parámetros de Validación

#### 5.2.5. Pruebas preliminares

Para las pruebas preliminares de validación se utilizó material de referencia proveniente de la empresa HYDROLAB y del Instituto Nacional de salud (INS). El material de referencia se encontraba distribuido en viales individuales de aproximadamente 3 ml cada uno. Los géneros de huevos de helmintos utilizados para las pruebas preliminares de validación pertenecían a: *Ascaris sp.*, *Diphillobothrium sp.*, *Toxocara sp.*, *Taenia sp.*, *Trichuris sp.*, *Fasciola sp.*, *Enterobius sp.* y *Macracanthorhynchus sp.* Las imágenes referenciales de cada uno de estos géneros como sus respectivos tamaños se pueden visualizar en el Anexo 8.

La preparación del pool de huevos de helmintos se realizó extrayendo una alícuota de 0.5 mL de cada género para luego ser mezclado en un tubo de centrifuga, a partir del cual se hicieron los cálculos necesarios para llegar a la concentración requerida y poder inocular las muestras de las matrices en estudio. Este procedimiento se realizó por cada analista.

El material interferente utilizado estuvo compuesto de sedimento aislado de una muestra de agua continental (río) el cual contenía quistes de protozoarios, quistes y huevos de rotíferos además de algunas especies de fitoplancton.

#### 5.2.6. Ejecución de pruebas.

**Preparación de Matrices.** Con el propósito de garantizar que las matrices utilizadas no contengan huevos de helmintos se realizaron los análisis de las matrices a inocular (agua envasada y agua de piscina) por sextuplicado en volúmenes de 10 litros.

**Inoculación y análisis.** En esta validación se trabajaron con dos niveles: bajo (5 huevos / muestra) y alto (20 huevos / muestra) para el desarrollo de las pruebas y cálculo de todos los parámetros, salvo para calcular los límites de detección y cuantificación. Para estos últimos se consideraron 3 niveles (nivel bajo: 1 huevo / muestra, medio; 5 huevos / muestra y alto: 20 huevos / muestra). La contaminación artificial de las muestras para los niveles bajo y alto se realizó colectando 120 litros en un recipiente de plástico de aproximadamente 150 litros, luego de homogenizar la muestra se distribuyó el contenido en 12 baldes con 10 litros cada uno, 10 de los cuales fueron utilizados para los ensayos respectivos y los otros 2 para el control blanco y control negativo (interferentes: suspensión de plancton continental), como se observa en la figura 13. Luego se inocularon los baldes con la suspensión de huevos de helmintos preparados previamente para cada nivel. Finalmente se analizaron de acuerdo al procedimiento PR-106 v03: Detección y enumeración de huevos de helmintos en agua.

En el Anexo 9 se puede ver una imagen referencial del material utilizado para las pruebas preliminares, mientras que en el Anexo 10 se observa la fotografía de huevos pertenecientes a *Ascaris Lumbricoides* y *Toxocara sp.*, encontrados durante el desarrollo de las pruebas.

Brevemente, el procedimiento de análisis consistió en filtrar la muestra de agua utilizando un equipo de filtración y membranas filtrantes con un tamaño de poro de 5 µm de diámetro. Luego, el filtro se transfirió a una placa Petri donde se procedió a lavarla con un raspado suave de toda la superficie utilizando un cubre objetos. La suspensión generada se aspiró con la ayuda de una pipeta Pasteur hacia un tubo de centrifuga de 5 ml. Finalmente, luego de homogeneizar, se transfirió a la cámara de Sedgewick Rafter (McMaster) para la observación al microscopio.



**Figura 13.** Distribución e Inoculación de las Muestras para las Pruebas Preliminares  
Nota. Esta distribución e inoculación se hizo por cada analista y por cada nivel.

### 5.2.7. Desarrollo de parámetros

Luego de obtener las lecturas y resultados de los análisis para cada una de las muestras, tanto para el nivel alto y bajo de ambas matrices, se procedió a calcular los parámetros mencionados en la sección 5.2.4.

**Parámetros cualitativos.** A continuación, se detallan los parámetros.

**Sensibilidad.** Es la fracción de resultados positivos correctamente asignados en la inspección previa (Laso, 2005). Para esta prueba cualitativa se tuvo en cuenta las muestras inoculadas con huevos de helmintos y las muestras identificadas como blanco y como interferentes, las identificaciones de cada una de ellas fueron desconocidas por los analistas.

$$\text{Sensibilidad} = \text{Verdaderos Positivos (VP)} / \text{Total contaminados (VP+FN)}$$

**Especificidad.** Es la fracción total de resultados negativos asignados correctamente en la inspección previa (Laso, 2015). Este parámetro permite conocer si el método es capaz de diferenciar los analitos positivos de los negativos. Se trata de evaluar si los analistas saben distinguir los interferentes de los analitos para no reportarlos como positivos. Los resultados se reportan en una tabla de contingencia.

$$\text{Especificidad} = \text{Verdaderos Negativos (VN)} / \text{Total No contaminados (FP+VN)}$$

**Falsos positivos.** Esto se da cuando el resultado verdadero es negativo; es decir, cuando se obtiene resultados positivos siendo la referencia negativa (Laso, 2015). Se trata de ver hay muestras negativas (interferentes) reportadas como positivas.

$$\text{FP} = \text{Falsos Positivos (FP)} / \text{Total Negativos (FP + VN)}$$

**Falsos negativos.** Este se da cuando el resultado verdadero es positivo; es decir, se obtienen resultados negativos siendo la referencia positiva (Laso, 2015). Este parámetro nos permite ver si hay reportes de huevos de helmintos confundidas con interferentes.

$$FN = \text{Falsos Negativos (FN)} / \text{Total Positivos (VP + FN)}$$

Para estos 4 parámetros se evaluaron los índices de validez de acuerdo a la tabla de contingencia (tabla 10).

**Tabla 10.** Tabla de Contingencia

Resultado	Estado de las Muestras		Total
	Contaminado	No contaminado	
Positivo	VP	FP	VP + FP
Negativo	FN	VN	FN + VN
			N=
TOTAL	VP + VN	FP + VN	[(VP+FN)+(FP+VN)] o [(VP+FP)+(FN+VN)]

*Nota.* VP = Verdaderos positivos; FN = Verdaderos negativos; FP = Falsos positivos; FN = Falsos negativos.

**Límite de detección.** Es la menor cantidad del analito, en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente puede ser cuantificado en condiciones de laboratorio de rutina (Camaró et al., 2013). Criterio de aceptación: Las muestras positivas deben ser mayor o igual al 70% de las muestras inoculadas. Para determinar el límite de detección se consideraron tres niveles con 10 muestras cada uno. Para el nivel 1 (1 huevo por litro), nivel 2 (5 huevos por litro) y nivel 3 (20 huevos por litro).

**Prueba de bondad de ajuste.** Es la asignación correcta de valores obtenidos frente a lo esperado. Se utiliza una prueba  $X^2$  a un alfa de 0.05. Se aplica esta prueba para determinar si lo observado es lo esperado de las pruebas de acuerdo a la prueba de  $X^2$ :

$$x^2 = \sum \frac{(Obs - Esp)^2}{Esp}$$

Este estadístico se utiliza para evaluar los parámetros de Sensibilidad, Especificidad, Falsos positivos y Falsos negativos.

**Parámetros cuantitativos.** A continuación, se detallan los parámetros.

**Límite de Cuantificación.** Según DA-acr-20D (2017), “Es la concentración mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. Se establece examinando una muestra o material de referencia apropiado”. Criterio de aceptación: Este se determinó en el presente estudio. Para determinar el límite de cuantificación se consideraron tres niveles con 10 muestras cada uno. Para el nivel 1 (1 huevo por muestra), nivel 2 (5 huevos por muestra) y nivel 3 (20 huevos por muestra).

**Repetibilidad.** Según ISO 3534-1 (2006), “Es la precisión bajo condiciones de repetibilidad. Condiciones donde se obtienen resultados independientes, con el mismo método, sobre idénticas muestras, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, y utilizando los mismos equipos de medición, durante un corto intervalo de tiempo.” Para ejecutar los análisis de repetibilidad se inocularon suspensiones de huevos de helmintos en cada uno de los 10 baldes con 10 litros cada uno para ambas matrices, los que serán analizado por los 5 analistas. Para el cálculo de este parámetro se utilizó la siguiente fórmula.

$$sr = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde:

$sr$  = Repetibilidad por cálculo de la desviación estándar de los recuentos de cada analista

$x$  = Cada una de las lecturas o sus logaritmos

$\bar{x}$  = Promedio de las lecturas

$n$  = Numero de lecturas

*Criterio de aceptación:*

$$r < 2.8 Sr$$

Donde:

$r$  = Límite de repetibilidad

$Sr$  = Desviación estándar de repetibilidad

Este criterio responde a una  $t$  de student de 2 colas con un nivel de confianza del 95%.

**Reproducibilidad.** Según ISO 3534-1 (2006), “Es la precisión bajo condiciones de reproducibilidad. Condiciones bajo las cuales los resultados se obtienen con el mismo método, sobre muestras idénticas, en laboratorios diferentes, con operadores distintos y utilizando equipos diferentes.” Para los ensayos de reproducibilidad se analizaron 60 muestras de las cuales 10 correspondieron a blancos e interferentes. En esta validación se determinó la reproducibilidad del método tomando como referente los resultados obtenidos por el analista de mayor experiencia. Los resultados de las lecturas obtenidas se convirtieron a logaritmos para realizar los análisis estadísticos. Para la determinación de la reproducibilidad se calculó la desviación estándar de los promedios de las lecturas realizadas por todos los analistas en cada nivel de inoculación.

*Criterio de aceptación:*

$$R < 2.8 SR$$

Donde:

$R$  = Límite de reproducibilidad

$SR$  = Desviación estándar de reproducibilidad

Para este parámetro también se utilizó un nivel de confianza del 95%.

**Recuperación (veracidad).** Es la expresión de qué tan cerca está la media de un número infinito de resultados, obtenidos a través del método, a un valor de referencia (EURACHEM, 2014). El porcentaje de recuperación de cada uno de los analistas se evaluó a partir de los recuentos obtenidos en los ensayos de repetibilidad. De acuerdo a los ensayos interlaboratorios realizados a nivel internacional se observa que el porcentaje de recuperación varía ampliamente desde 30% hasta 70%, es decir este porcentaje de recuperación es muy variable. En base a esto, en el presente estudio se estableció como criterio de aceptación inicial un nivel de recuperación  $\geq 50\%$  hasta establecer un límite



propio del laboratorio. Como criterio de aceptación se establece que el porcentaje de recuperación de cada analista debe ser mayor o igual al 70% de las muestras inoculadas.

**Robustez.** Según DA-acr-20D (2017), “Es la medida de la resistencia de un método al cambio de respuesta cuando se introducen pequeñas variaciones en el procedimiento.” Existe una menor fiabilidad de los resultados cuando el método no es robusto, ya que se produce un aumento de la variabilidad del mismo (Lightfoot y Maier, 2002). Este parámetro permitió conocer si el método es robusto. Es decir, si los resultados no son muy sensibles a las variaciones de las condiciones experimentales. Tales condiciones experimentales pueden ser: temperatura, tiempo de análisis, duración de la extracción o agitación, técnica utilizada, pH, concentración de reactivos, tamaño de la muestra, etc. Para determinar este parámetro se utilizó el test de robustez de Youden-Steiner cuya estructura de factores y número de ensayos se puede ver en la tabla 11.

**Tabla 11.** Test de Robustez de Youden-Steiner

Factores	Número de ensayos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	B	B	b	b	B	B	b	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	D	D	d	d	d	d	D	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e	E
F,f	F	f	f	F	F	f	f	F
G,g	G	g	g	G	g	G	G	g
RESULTADOS	S	t	u	v	w	x	y	z

Se determinó el efecto de los valores utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\sum Y_{A+} - \sum Y_{A-}}{4}$$

Donde:

$\sum Y_{A+}$ : Sumatoria de resultados con valores altos.

$\sum Y_{A-}$ : Sumatoria de resultados con valores bajos.

Los signos + y – representan a los valores altos y bajos respectivamente

*Criterio de aceptación:* Los promedios por cada factor deben ser menores a  $\sqrt{2} * SD$ . Es decir, la diferencia entre el valor alto (A) y el valor bajo (a) debe ser menor a  $\sqrt{2}$  por la desviación estándar de todos los resultados obtenidos. Los factores de evaluación establecidos para el estudio de validación se muestran en la tabla 12.

**Tabla 12.** Factores de Evaluación para la Validación

Factor	Condición	Valores
Tamaño de membrana	A	5 $\mu$ m
	a	0.8 $\mu$ m
Volumen de muestra	B	10 litros
	b	1 litro
Tipo de pipeta	C	Micropipeta
	c	Pipeta de vidrio
Tiempo de reposo en la cámara	D	60 minutos
	d	5 minutos
Tipo de microscopio	E	Vertical
	e	Invertido

***Incertidumbre.*** Según ISO 3534-1 (2006), “Es el estimado aplicado a un resultado de un ensayo, que caracteriza el rango de valores dentro de los cuales se dice que se encuentra el valor verdadero.” Se determinó 4 fuentes de incertidumbre combinada  $w_c^2$  para el análisis de huevos de helmintos. Estos fueron:

Incertidumbre de los recuentos por los analistas  $w_t^2$

Incertidumbre de la distribución de los organismos  $w_z^2$

Incertidumbre del volumen de la alícuota  $w_v^2$

Incertidumbre del volumen de muestra  $w_{vm}^2$

*Criterio de aceptación:* Luego de identificar las fuentes de incertidumbre en la validación se determinará los límites de incertidumbre del laboratorio para cada nivel en cada matriz.

### **5.3. Resultados**

Al ser un trabajo monográfico los resultados de las lecturas obtenidos no se mostrarán; sin embargo, se mostrará el resultado final de alguno de los parámetros.

#### **5.3.1. Límite de detección y cuantificación**

Para el caso de agua envasada y el nivel más bajo (1 huevo / 10 litros), solo se detectó el analito en el 38% de las muestras, por tanto, no podemos establecer que a ese nivel podemos detectar el huevo inoculado, ya que para ser considerado como límite de detección al menos se debe encontrar el o los huevos inoculados en un 70% de las muestras. En el nivel medio (5 huevos / 10 litros) se detectaron todos los huevos en un 100% de todas las muestras por lo que el límite de detección y cuantificación para el agua envasada es de 5 huevos por 10 litros. Por otro lado, para el agua de piscina, para el nivel bajo el porcentaje de muestras en el que se detectó el huevo fue de 54% para el nivel bajo. Para el nivel medio se detectaron los huevos en el 100% de las muestras, quedando como límite de detección y cuantificación para esta matriz también 5 huevos / 10 litros.

#### **5.3.2. *Sensibilidad, Especificidad, Falsos positivos y falsos negativos***

La tabla de contingencia (Tabla 13), obtenida a partir de los resultados de las lecturas, se utiliza para calcular la sensibilidad, especificidad, falsos positivos y falsos negativos. Estos resultados representan el total de las muestras analizadas por los 5 analistas (10 muestras contaminadas y 2 no contaminadas por analista), y la tabla es la misma para los dos tipos de matrices con los dos niveles trabajados.

**Tabla 13.** Tabla de Contingencia con Resultados

Resultado	Estado de las Muestras		Total
	Contaminado	No contaminado	
Positivo	50	0	50
Negativo	0	10	10
TOTAL	50	10	60

Utilizando las fórmulas antes descritas para los parámetros se calcula que tanto para Sensibilidad como la Especificidad se obtiene un resultado igual a 1, esto indicaría que el método es sensible y específico en un 100%. Mientras que el resultado para los Falsos Positivos y Negativos es igual a 0, lo que indicaría que el porcentaje de resultados reportados como falsos positivos y falsos negativos es 0%. Además, la prueba de bondad de ajuste arrojó que los resultados observados y esperados son iguales en base a la prueba  $X^2$  y a un alfa de 0.05.

### 5.3.3. Repetibilidad y Reproducibilidad

Para los cálculos de repetibilidad y reproducibilidad se tomaron solamente los resultados positivos, a los cuales se aplicaron pruebas estadísticas para ver su normalidad, detectar datos atípicos y para determinar diferencias significativas de los resultados entre analistas mediante una prueba de Tukey. Todos los recuentos obtenidos fueron convertidos a logaritmo y se calculó el límite de repetibilidad y reproducibilidad utilizando las fórmulas descritas líneas arriba. La tabla 14 muestra el límite de repetibilidad para cada analista, estos límites indican la máxima diferencia tolerable permitida entre los resultados obtenidos de manera independiente bajo condiciones de repetibilidad por analista. La tabla 15 muestra el límite de repetibilidad y reproducibilidad global para el laboratorio. Se debe recordar que para el cálculo de la reproducibilidad se compararon los resultados obtenidos por cada analista y los resultados obtenidos por el analista de más experiencia, tomando a este como el valor de referencia.

**Tabla 14.** Límite de Repetibilidad de cada Analista

	Matriz			
	Agua envasada		Agua de piscina	
	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto
Analista 1	0.1489	0.1722	0.6154	0.1607
Analista 2	0.2840	0.0980	0.2580	0.1212
Analista 3	0.3492	0.1043	0.5421	0.1590
Analista 4	0.3677	0.1149	0.5421	0.2034
Analista 5	0.3234	0.1541	0.4243	0.1954

**Tabla 15.** Límite de Repetibilidad y Reproducibilidad Global del Laboratorio

	Matriz			
	Agua envasada		Agua de piscina	
	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto
Límite de repetibilidad global	0.2946	0.1287	0.4503	0.1679
Límite de reproducibilidad global	0.147	0.031	0.191	0.037

Como todas las diferencias son menores a los límites tanto de repetibilidad y reproducibilidad por tanto se concluye que a un nivel de confianza de 95% el método es repetible y reproducible.

#### 5.3.4. Porcentaje de recuperación (Veracidad)

La tabla 16 muestra el porcentaje de recuperación para ambas matrices en los dos niveles. Recordar que la veracidad mide el grado de concordancia de un valor de tendencia central respecto a un valor de referencia. El valor de referencia para nivel bajo fue de 6 huevos por muestra y para el nivel alto fue de 24 huevos por muestra.

**Tabla 16.** Porcentaje de Recuperación por Analista para las Dos Matrices

	Matriz			
	Agua envasada		Agua de piscina	
Analistas	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto
Analista 1	83.33	74.24	65.15	72.35
Analista 2	70.00	75.20	96.67	76.40
Analista 3	80	82.92	71.67	75.42
Analista 4	93.33	86.96	85	85.22
Analista 5	79.33	83.48	81.67	80.43
PROMEDIO	81.198	80.56	80.032	77.964

Como se ve en la tabla 16 para las dos matrices, a los dos niveles, se obtuvo porcentajes de recuperación altos. El promedio mínimo del porcentaje de recuperación es 77.96 %, este corresponde al nivel alto para agua de piscina, que representa la muestra con mayor probabilidad de contaminación. Por lo tanto, para tener un poco más de cobertura en este aspecto se fijó el límite de recuperación en 70% para el laboratorio.

#### 5.3.5. Robustez

La tabla 17 muestra la robustez del método para cada uno de los factores considerados en la validación. Los promedios obtenidos para cada factor no superan el límite tabular al 95% de confianza, a excepción del factor volumen. De este se concluye que el método es robusto para todos los factores en ambas matrices, menos para el factor volumen. Es decir, si se filtra solo 1 litro de la muestra en lugar de los 10 litros se obtendrán resultados con valores no confiables.

**Tabla 17.** Robustez del Método para Cada Uno de los Factores Seleccionados

Factores	Agua envasada			Agua de piscina		
	Promedios	Límite	Condición	Promedios	Límite	Condición
Tamaño de poro	2.50	3.48	Robusto	1.40	3.82	Robusto
Volumen	5.50*	3.48	No Robusto	6.20*	3.82	No Robusto
Tipo de pipeta	1.00	3.48	Robusto	1.80	3.82	Robusto
Tiempo en la cámara	1.00	3.48	Robusto	0.90	3.82	Robusto
Tipo de microscopio	1.50	3.48	Robusto	1.60	3.82	Robusto

*Nota.* \* Promedios superiores a los límites establecidos para cada matriz.

### 5.3.6. Incertidumbre

Los límites de la incertidumbre del laboratorio para ambas matrices y los dos niveles se muestran en la tabla 18. De esta manera se determinan los rangos o los posibles intervalos dentro de los cuales se puede decir que los resultados son confiables o se encuentra el valor verdadero.

**Tabla 18.** Límites de Incertidumbre para Ambas Matrices

	Agua envasada		Agua de piscina	
	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto
Resultado	$5 \pm 5$	$20 \pm 9.37$	$5 \pm 4.89$	$20 \pm 9.48$
Límite inferior	0.00	10.6	0.11	10.5
Límite superior	10.00	29.4	9.89	29.5

#### **5.4. Conclusión y Revalidación**

De acuerdo a los ensayos realizados y a la demostración de que el método cumple, estadísticamente, cada uno de los parámetros de validación se concluyó y aseguró que este método es adecuado para la detección y enumeración de huevos de helmintos en los dos tipos de agua seleccionados: agua envasada (baja probabilidad) y agua de piscina (alta probabilidad). Luego de validar el método continúa el proceso de acreditación, este proceso ya fue descrito en el capítulo anterior.

En cuanto a la revalidación del método, este se realizará cuando exista cualquier cambio en el documento o en el método de ensayo, ambiente, equipos o de fondo (cambio en las características intrínsecas del método). De conservarse todas las características iniciales será revalidado cada 6 años.

Los controles establecidos para el ensayo son:

Control del equipo: Para este control se realizó la filtración de un litro de agua destilada esterilizada utilizando una membrana con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

Control positivo: Para este control se analizó 1 litro de agua con una suspensión de huevos de helmintos a una concentración conocida (aproximadamente 10 huevos / litro).

Finalmente, si alguno de los parámetros de validación no cumple estadísticamente se tendría que cambiar la metodología del método de tal forma que cumplan todos los parámetros establecidos por el DA-acr-20D.



## **VI. CONCLUSIONES**

- El analista, a través de su formación académica y de la competencia adquirida durante su etapa laboral, es capaz de realizar los análisis microbiológicos respectivos para las muestras de alimentos y agua generando resultados confiables.
- La participación del analista, en el proceso de acreditación, permitió que este se llevara a cada de la manera más adecuada logrando la acreditación de los nuevos métodos para el análisis microbiológico en distintas matrices de agua.
- La participación del analista permitió lograr la validación de un nuevo método de ensayo para la detección y cuantificación de huevos de helmintos en agua de bebida y piscina, como parte del proceso de implementación del laboratorio de parasitología.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baird, R. B., Eaton, A. D. y Rice, E. W. (2017). Standard Methods for the examination of water and wastewater (23rd ed.). American Water Works Association (AWWA, WEF and APHA).
- Arosquipa, P. (2014). Calidad Microbiológica de los alimentos preparados sin tratamiento térmico por el programa de complementación alimentaria de los comedores pertenecientes al distrito Coronel Gregorio Albarracín de la ciudad de Tacna [Tesis de grado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann].
- Camaró-Sala, M., Martínez-García, R., Olmos-Martínez, P., Catalá-Cuenca, V., Ocete-Mochón, M. & Gimeno-Cardona, C. (2013). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(7), e31-e36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.010>
- D. S. N° 003-2010-MINAM. Aprueban Límites Máximos Permisibles para los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales. *Diario Oficial El Peruano* (2010). Recuperado de [https://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/09/ds\\_003-2010-minam.pdf](https://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/09/ds_003-2010-minam.pdf)
- D. S. N° 004-2017-MINAM. Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y establecen Disposiciones Complementarias. *Diario Oficial El Peruano* (2017). Recuperado de <https://www.minam.gob.pe/disposiciones/decreto-supremo-n-004-2017-minam/>
- D. S. N.° 031-2010-SA. Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano. *Diario Oficial El Peruano* (2011). Recuperado de [http://www.digesa.minsa.gob.pe/publicaciones/descargas/Reglamento\\_Calidad\\_Agua.pdf](http://www.digesa.minsa.gob.pe/publicaciones/descargas/Reglamento_Calidad_Agua.pdf)
- Dirección General de Salud Ambiental [DIGESA]. (2010). *El gran reto de salud: la inocuidad de los alimentos*. Recuperado de <http://www.digesa.minsa.gob.pe/compial/compial.asp>

- Dortet, L., Veiga-Chacon, E., y Cossart, P. (2009). *Listeria Monocytogenes*. *Encyclopedia of Microbiology (4ta ed.)*, pp 803-818. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02297-2>
- Magnusson, B. & Örnemark, U. Eurachem Guide. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2nd ed.). <http://www.eurachem.org>
- Food and Drug Administration [FDA]. (2015). *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*.
- Gnanamani, A., Hariharan, P. & Paul-Satyaseela, M. (2017). *Staphylococcus aureus: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach*. <http://dx.doi.org/10.5772/67338>
- Hailegebreal, G. (2017). A Review on *Clostridium Perfringens* Food Poisoning. *Global Research Journal of Public Health and Epidemiology*, Vol. 4(3), 104-109. Recuperado de <http://springjournals.net/full-articles/springjournals.netgrjpharticlesindex=3gizachew.pdf?view=inline>
- Hoyos, K., Vidal, J. & Olivera, M. (2018). Validación de método cualitativo para detección de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* en muestras de leche para diagnóstico de mastitis bovina. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, 21(1), 271-275. <https://doi.org/10.31910/rudca.v21.n1.2018.687>
- Húngaro, H., Peña, W., Silva, N., Carvalho, R., Ortiz, V. & Sant'Ana, A. (2014). Food Microbiology. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems, Volume 3*, 213-231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00059-0>
- Instituto Nacional de Calidad [INACAL] (2017). Directriz para la validación de métodos de ensayo. Comité técnico. Recuperado de [https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/4/jer/documentosespecificos/files/Directrices%2FDA-acr-20D-DIRECTRIZ.PARA.LA.VALIDACION.DE.METODOS.DE.ENSAYO\(1\).pdf](https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/4/jer/documentosespecificos/files/Directrices%2FDA-acr-20D-DIRECTRIZ.PARA.LA.VALIDACION.DE.METODOS.DE.ENSAYO(1).pdf)
- Instituto Nacional de Calidad [INACAL]. Reglamento para la acreditación de organismos de evaluación de la conformidad (DA-ACR-01R). Recuperado de <https://www.inacal.gob.pe/acreditacion/categoria/documentos-generales>

- Instituto Nacional de Calidad [INACAL]. Procedimiento general de acreditación (DA-acr-01P). Recuperado de <https://www.inacal.gob.pe/acreditacion/categoria/documentos-generales>
- Instituto Nacional de Calidad [INACAL]. Directriz de criterios para la participación en ensayos de aptitud/comparaciones interlaboratorios (DA-acr-13D). Recuperado de <https://www.inacal.gob.pe/acreditacion/categoria/documentos-especificos>
- Instituto Nacional de Calidad [INACAL]. Directriz para la validación de métodos de ensayo (DA-acr-20D). Recuperado de <https://www.inacal.gob.pe/acreditacion/categoria/documentos-especificos>
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods [ICMSF]. (2000). *Microorganismos de los alimentos 1. Su significado y sus métodos de enumeración*. (2da ed.). ACRIBIA S.A.
- International Organization for standardization [ISO]. (1994). *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results (ISO 5725-1)*.
- International Organization for standardization [ISO]. (2006). *Statistics - Vocabulary and symbols - Part 1: General statistical terms and terms used in probability (ISO 3534-1)*.
- International Organization for standardization [ISO]. (2015). *Sistemas de gestión de la calidad – fundamentos y vocabulario (ISO 9000)*. Traducción oficial. 4ta Edición.
- International Organization for standardization [ISO]. (2017). *Evaluación de la conformidad — Requisitos para los organismos de acreditación que realizan la acreditación de organismos de evaluación de la conformidad (ISO/IEC 17011)*. Traducción oficial.
- ISO/IEC 17025. (2017). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios (3era Edición ed.)*. Lima, Perú.
- Laso, J. (2005). Situación de la validación de los ensayos microbiológicos en los laboratorios. *Tercer Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios*.
- Ley N° 1062. Ley de inocuidad de los alimentos (2008). Lima, Perú Recuperado de <https://leyes.congreso.gob.pe/Documentos/DecretosLegislativos/01062.pdf>.

- Lightfoot, H. M. (2002). *Análisis microbiológico de alimentos y aguas. Directrices para el aseguramiento de la calidad* (1era ed.). ACRIBIA S.A.
- Madigan T., Martinko J, Dunlap P. & Clark D. (2009). *Biología de los microorganismos* (12ª ed.). Editorial Pearson.
- Ministerio de Salud [MINSa]. (2019). *Boletín Epidemiológico Semanal XV-Volumen 28 SE 15-2019 (del 07 al 13 de abril del 2019)*. Lima, Perú.
- Ministerio de Salud [MINSa]. (2008). *Norma Sanitaria que Establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano*. Perú.
- Mohammed, S. (2019). A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*, 12(4), 504-521.
- Nelson, K. (2003). Concentrations and inactivation of Ascaris eggs and pathogen indicator organisms in wastewater stabilization pond sludge. *Water Science and Technology*, 48(2), 89-95. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0093>
- Norma mexicana. (2012). *Análisis de agua – medición del número de huevos de helmintos en aguas residuales y residuales tratadas por observación microscópica– método de prueba* (MX-AA-113-SCFI-2012).
- Norma técnica peruana [NTP]. (2005). *Evaluación de la conformidad. Vocabulario y principios generales* (NTP-ISO/IEC 17000). 1era Edición.
- Norma técnica peruana [NTP]. (2009). *QUINUA (Chenopodium quinoa Willd). Requisitos* (NTP 205.062). 1era Edición.
- Norma técnica peruana [NTP]. (2012). *Calidad de agua. Clasificación de la matriz agua para ensayos de laboratorio* (NTP 214.042). 1era Edición.
- OMS (Organización Mundial de la Salud, Suiza). (2018). *Guías para la calidad del agua de consumo humano* (4ta ed.). Recuperado de [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/gdwq4-with-add1-chapters/es/](https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/gdwq4-with-add1-chapters/es/)

- OMS (Organización Mundial de la Salud, Suiza). (2019). *La inocuidad de los alimentos es responsabilidad de todos*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news/item/06-06-2019-food-safety-is-everyones-business>
- Pacombia, E. (2017). *Identificación de Escherichia coli en carnes molidas de res comercializados en los principales mercados del distrito de Tacna, Julio a Setiembre 2016* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann]. Recuperado de <http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/2356>
- R. M. N° 591-2008. MINSA/DIGESA-V.01 del 27 de agosto del 2008. Norma Sanitaria que Establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano. Perú. Recuperado de <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/247682-591-2008-minsa>
- R. M. N° 1020-2010. MINSA. Norma Sanitaria para la fabricación, elaboración y expendio de productos de panificación, galletería y pastelería. Recuperado de <http://www.digesa.minsa.gob.pe/orientacion/NORMA%20DE%20PANADERIAS.pdf>
- Ríos-Tobón, S., Agudelo-Cadavid, R. & Gutiérrez-Builes, L. (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 35(2), 236-247. <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08>
- Silveira, R., Oliveira, C., Carvalho, R. & Faria, F. (2015). *Clostridium perfringens*: a review of the disease in pigs, horses and broiler chickens. *Ciência Rural*, 45(6), 1027-1034. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140927>
- Sowjanya, P., Subashini, D. & Lakshmi, K. (2015). Analytical Validation Parameters. *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(1), 65-74.
- Tarqui, C., Alvarez, D., Gómez, G., Valenzuela, R., Fernandez, I. & Espinoza, P. (2016). Calidad bacteriológica del agua para consumo en tres regiones del Perú. *Rev. Salud Pública.*, 18(6), 904-912. <https://doi.org/10.15446/rsap.v18n6.55008>
- Vásquez, A. (2011). *Validación método de filtración para detección de protozoarios y Helminths en muestras de hortalizas* [Tesis de grado, Universidad de El Salvador] Recuperado de <http://ri.ues.edu.sv/627/1/10137334.pdf>.
- Vocabulario Internacional de Metrología [VIM]. (2012). *Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados* (3ra ed.). Recuperado de

[https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/5/jer/boletinmetrologia/files/VI\\_M\\_2012\\_%20INACAL.pdf](https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/5/jer/boletinmetrologia/files/VI_M_2012_%20INACAL.pdf)

Zagal, E. & Sadzawka, A. (2007). *Implementación del sistema para la validación de los métodos de análisis y mediciones de laboratorio en suelos y lodos*. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Chillán. Chile. Recuperado de [https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/GUIA\\_VALIDACION\\_LABORATORIO\\_S.pdf](https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/GUIA_VALIDACION_LABORATORIO_S.pdf)

## **VIII. ANEXOS**



**Anexo 1.** Tabla NMP para la Estimación de la Densidad Bacteriana Cuando se Utilizan 5 Tubos por Dilución.

TABLE 9221:IV. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATIONS OF POSITIVE RESULTS WHEN FIVE TUBES ARE USED PER DILUTION (10 mL, 1.0 mL, 0.1 mL)\*

Combination of Positives	MPN Index/100 mL	Confidence Limits		Combination of Positives	MPN Index/100 mL	Confidence Limits	
		Low	High			Low	High
0-0-0	<1.8	—	6.8	4-0-3	25	9.8	70
0-0-1	1.8	0.090	6.8	4-1-0	17	6.0	40
0-1-0	1.8	0.090	6.9	4-1-1	21	6.8	42
0-1-1	3.6	0.70	10	4-1-2	26	9.8	70
0-2-0	3.7	0.70	10	4-1-3	31	10	70
0-2-1	5.5	1.8	15	4-2-0	22	6.8	50
0-3-0	5.6	1.8	15	4-2-1	26	9.8	70
1-0-0	2.0	0.10	10	4-2-2	32	10	70
1-0-1	4.0	0.70	10	4-2-3	38	14	100
1-0-2	6.0	1.8	15	4-3-0	27	9.9	70
1-1-0	4.0	0.71	12	4-3-1	33	10	70
1-1-1	6.1	1.8	15	4-3-2	39	14	100
1-1-2	8.1	3.4	22	4-4-0	34	14	100
1-2-0	6.1	1.8	15	4-4-1	40	14	100
1-2-1	8.2	3.4	22	4-4-2	47	15	120
1-3-0	8.3	3.4	22	4-5-0	41	14	100
1-3-1	10	3.5	22	4-5-1	48	15	120
1-4-0	11	3.5	22	5-0-0	23	6.8	70
2-0-0	4.5	0.79	15	5-0-1	31	10	70
2-0-1	6.8	1.8	15	5-0-2	43	14	100
2-0-2	9.1	3.4	22	5-0-3	58	22	150
2-1-0	6.8	1.8	17	5-1-0	33	10	100
2-1-1	9.2	3.4	22	5-1-1	46	14	120
2-1-2	12	4.1	26	5-1-2	63	22	150
2-2-0	9.3	3.4	22	5-1-3	84	34	220
2-2-1	12	4.1	26	5-2-0	49	15	150
2-2-2	14	5.9	36	5-2-1	70	22	170
2-3-0	12	4.1	26	5-2-2	94	34	230
2-3-1	14	5.9	36	5-2-3	120	36	250
2-4-0	15	5.9	36	5-2-4	150	58	400
3-0-0	7.8	2.1	22	5-3-0	79	22	220
3-0-1	11	3.5	23	5-3-1	110	34	250
3-0-2	13	5.6	35	5-3-2	140	52	400
3-1-0	11	3.5	26	5-3-3	170	70	400
3-1-1	14	5.6	36	5-3-4	210	70	400
3-1-2	17	6.0	36	5-4-0	130	36	400
3-2-0	14	5.7	36	5-4-1	170	58	400
3-2-1	17	6.8	40	5-4-2	220	70	440
3-2-2	20	6.8	40	5-4-3	280	100	710
3-3-0	17	6.8	40	5-4-4	350	100	710
3-3-1	21	6.8	40	5-4-5	430	150	1100
3-3-2	24	9.8	70	5-5-0	240	70	710
3-4-0	21	6.8	40	5-5-1	350	100	1100
3-4-1	24	9.8	70	5-5-2	540	150	1700
3-5-0	25	9.8	70	5-5-3	920	220	2600
4-0-0	13	4.1	35	5-5-4	1600	400	4600
4-0-1	17	5.9	36	5-5-5	>1600	700	—
4-0-2	21	6.8	40				

\* Results to two significant figures.

**FUENTE:** Tabla obtenida del Standard Methods for the examination of water and wastewater (23rd ed.). 9221 C.

**Anexo 2.** Tabla NMP para la Estimación de Densidad Bacteriana Cuando se Utiliza 10 Porciones de 10 ml Cada Una.

TABLE 9221:III. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR ALL COMBINATIONS OF POSITIVE AND NEGATIVE RESULTS WHEN TEN 10-mL PORTIONS ARE USED

No. of Tubes Giving Positive Reaction Out of 10 (10 mL Each)	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits (Exact)	
		Lower	Upper
0	<1.1	–	3.4
1	1.1	0.051	5.9
2	2.2	0.37	8.2
3	3.6	0.91	9.7
4	5.1	1.6	13
5	6.9	2.5	15
6	9.2	3.3	19
7	12	4.8	24
8	16	5.8	34
9	23	8.1	53
10	>23	13	–

**FUENTE:** Standard Methods for the examination of water and wastewater (23rd ed.).9221 C.

**Anexo 3.** Lista de Material de Referencia (cepas) del Laboratorio de Microbiología.

N°	CEPA	ATCC
CTRL-01	<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922
CTRL-02	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis ( <i>grupo D</i> )	ATCC® 13076
CTRL-03	<i>Enterobacter aerogenes</i> ( <i>Klebsiella aerogenes</i> )	ATCC® 13048
CTRL-04	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ATCC® 25923
CTRL-05	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC® 14579
CTRL-06	<i>Saccharomyces cereviceae</i>	ATCC® 9763
CTRL-07	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC® 16404
CTRL-09	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	ATCC® 14028
CTRL-10	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 12453
CTRL-11	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC® 12228
CTRL-12	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Biespebjerg	ATCC® 9842
CTRL-13	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ATCC® 10145
CTRL-17	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC® 17802
CTRL-18	<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC® 13124
CTRL-19	<i>Vibrio cholerae</i> O1, serotipo Inaba	INS 0356-92
CTRL-20	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	ATCC® 6633
CTRL-21	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 29212
CTRL-22	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC® 27956
CTRL-23	<i>Serratia marcescens</i>	ATCC® 43862
CTRL-24	<i>Aerococcus viridans</i>	ATCC® 10400
CTRL-25	<i>Saccharomyces kudriavsevii</i>	ATCC® 2601
CTRL-28	<i>Listeria innocua</i> (serotype 6a)	ATCC® 33090
CTRL-29	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	ATCC® 19119
CTRL-30	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	ATCC® 64TM
CTRL-31	<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC® 6939
CTRL-32	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC® 12980
CTRL-33	<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC® 11437
CTRL-34	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC® 4356
CTRL-35	<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC® 334
CTRL-36	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115
CTRL-37	<i>Enterococcus faescium</i>	ATCC35667
CTRL-38	<i>Listeria seeligeri</i>	ATCC 35967
CTRL-39	<i>Eurotium rubrum</i>	ATCC 42690
CTRL-40	<i>Wallemia mellicola</i>	ATCC 42694
CTRL-41	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305
CTRL-42	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 43864

Anexo 4. Certificado de Calibración de la Incubadora con Código EMB-39.



LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO POR  
EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACION  
INACAL – DA CON REGISTRO N° LC - 001



**CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN N° TC-0258-2018**

Fecha de emisión : 2018-04-30

EXP.:75447  
Pág. 1 de 5

- 1. Solicitante** : CERTIFICACIONES Y CALIDAD S.A.C.
- 2. Dirección** : Av. Sucre N° 1361 - Pueblo Libre - Lima
- 3. Equipo calibrado** : **INCUBADORA**
- Marca / Fabricante : MEMMERT
  - Modelo : IF260 Plus
  - N° de serie : D615.0139
  - Identificación : EMB-39
  - Procedencia : Alemania
  - Tipo de ventilación : Turbulencia de Aire
  - Ubicación : Laboratorio de Microbiología
- 4. Temperatura de trabajo** : 35 °C ± 1 °C
- 5. Lugar de calibración** : Instalaciones de CERTIFICACIONES Y CALIDAD S.A.C.
- 6. Fecha de calibración** : 2018-04-19

**7. Metodo de calibración**

La calibración se realizó por comparación directa según el PC-01B: 2° Ed.  
"Procedimiento para la calibración o caracterización de medios isotermos con aire como medio termostático" (modificado) del INDECOPI-SNM.

**8. Trazabilidad**

Los resultados de calibración tienen trazabilidad a los patrones nacionales del INACAL-DM, en concordancia con el Sistema Internacional de Unidades (SI) y el Sistema de Unidades de Medida del Perú (SLUMP).

Código	Instrumento Patrón	Certificado de Calibración
IT-241	Termómetro digital con 10 sensores tipo K (K241-103 al K241-117) con incertidumbre (U) de 0,12 °C a 0,13 °C	T-0716-2018 METROIL S.A.C.
IT-001	Cronómetro digital con incertidumbre (U) desde 0,002 s hasta 0,005 s	CT-0045-2017 METROIL S.A.C.
IT-505	Termohigrómetro digital con incertidumbre (U) = 0,3 °C y 2,8 % H.R.	T-0005-2018 METROIL S.A.C.
IL-188	Cinta métrica con incertidumbre (U) = 1,1 mm	L-0935-2017 METROIL S.A.C.

**9. Condiciones ambientales**

Temperatura ambiental Inic.: 24,8 °C Fin.: 25,7 °C  
 Humedad relativa Inic.: 55,6 % H.R. Fin.: 59,4 % H.R.  
 Volumen interior (carga) 20 % (\*)

**10. Instrumento de medición del equipo**

Nombre	Intervalo de indicación	División mínima	Tipo
Termómetro controlador	20,0 °C a 70,0 °C	0,1 °C	Digital

Los resultados del certificado son válidos solo para el objeto calibrado y se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones y no deben utilizarse como certificado de conformidad con normas de producto.

Se recomienda al usuario recalibrar el equipo a intervalos adecuados, los cuales deben ser elegidos con base en las características del trabajo realizado, el mantenimiento, conservación y el tiempo de uso del equipo y del instrumento de medición.

METROIL S.A.C. no se responsabiliza de los perjuicios que pueda ocasionar el uso inadecuado de este equipo, ni de una incorrecta interpretación de los resultados de la calibración aquí declarados.

Este certificado de calibración es tratable a patrones nacionales o internacionales, los cuales realizan las unidades de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).

Este certificado de calibración no podrá ser reproducido parcialmente, excepto con autorización previa por escrito de METROIL S.A.C.

El certificado de calibración no es válido sin la firma del responsable técnico de METROIL S.A.C.

Anexo 5. Certificado de Calibración del Baño de Agua con Código EMB-05.



LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO  
POR EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACION  
INACAL – DA CON REGISTRO N° LC - 001



**CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN N° TC-0737-2018**

Fecha de emisión: 2018-09-19

EXP.: 75447  
Pág. 1 de 6

1. Solicitante : CERTIFICACIONES Y CALIDAD S.A.C.
2. Dirección : Av. Sucre N° 1361 - Pueblo Libre - Lima
3. Equipo calibrado : BAÑO TERMOSTÁTICO
  - Marca / Fabricante : TOMOS
  - N° de serie : 06010219
  - Identificación : EMB-05
  - Modelo : CDK-628
  - Procedencia : No indica
  - Líquido termostático : Agua destilada
  - Ubicación : Laboratorio de Microbiología
4. Temperatura de trabajo :  $44.5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$
5. Lugar de calibración : En las instalaciones de CERTIFICACIONES Y CALIDAD S.A.C.
6. Fecha de calibración : 2018-08-07

7. Método de calibración  
La calibración se efectuó por comparación directa según el PC-019, 1° Ed., "Procedimiento para la calibración de baños termostáticos" (VALIDADO) del INDECOPI-SNM.

8. Trazabilidad  
Los resultados de la calibración realizada tienen trazabilidad a los patrones nacionales del INACAL-DM, en concordancia con el Sistema Internacional de Unidades de Medida (SI) y el Sistema Legal de Unidades de Medida del Perú (SLUMP).

Los resultados del certificado son válidos solo para el objeto calibrado y se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones y no deben utilizarse como certificado de conformidad con normas de producto.

Se recomienda al usuario recalibrar el equipo a intervalos adecuados. Los cuales deben ser elegidos con base en las características del trabajo realizado, el mantenimiento, conservación y el tiempo de uso del equipo y del instrumento de medición.

METROL S.A.C. no se responsabiliza de los perjuicios que pueda ocasionar el uso inadecuado de este equipo, ni de una incorrecta interpretación de los resultados de la calibración aquí declarados.

Este certificado de calibración es válido a patrones nacionales o internacionales los cuales realizan los estados de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).

Este certificado de calibración no podrá ser reproducido parcialmente, excepto con autorización previa por escrito de METROL S.A.C.

El certificado de calibración no es válido sin la firma del responsable técnico de METROL S.A.C.

Código	Instrumento Patrón	Certificado de Calibración
IT-454	Termómetro digital con 11 sensores de resistencia de platino con incertidumbre (U) de 0.02 °C a 0.03 °C	LT-710-2017 INACAL-DM
IT3-001	Cronómetro digital con incertidumbre (U) de 0.002 s a 0.005 s	CT-0045-2017 METROL S.A.C.
IT-505	Termohigrómetro digital con incertidumbre (U) = 0,3 °C y 2,8 % H.R.	T-0006-2018 METROL S.A.C.
IL-188	Cinta métrica con incertidumbre (U) = 1,1 mm	L-0033-2017 METROL S.A.C.

9. Condiciones ambientales :
- |                          |                 |                |
|--------------------------|-----------------|----------------|
| Temperatura ambiental    | Inic: 23.2 °C   | Fin: 23.5 °C   |
| Humedad relativa         | Inic: 57 % H.R. | Fin: 60 % H.R. |
| Volumen interior (carga) | 80 % (*)        |                |

10. Instrumentos de medición del equipo :

Nombre	Intervalo de indicación	División mínima	Tipo
Termómetro controlador	0,0 °C a 99,9 °C	0,1 °C	Digital

METROLOGÍA E INGENIERÍA LINO S.A.C.  
Av. Venezuela N° 2040 Lima 01 – Perú Central Telef.: (511) 713-9090 / (511) 713-5656 / 999 072 424  
Consulta Técnica: (511) 713-5610 / 975 432 445 / RPM #958 436 704 E-mail: ventas@metroil.com.pe / Web: www.metroil.com.pe

## Anexo 6. Competencia Técnica para Recuento de Coliformes Totales mediante Membrana Filtrante para Agua de Uso y Consumo Humano.

### INFORME DE RESULTADOS 167-LMB-15 PARA LA COMPETENCIA TECNICA DEL ANALISTA

FECHA DEL ANALISIS 4/24/2015 ORDEN DE TRABAJO: 1285.0415  
 NOMBRE DEL ANALISTA XTOPHER QUISPE JURADO  
 PRODUCTO Agua Potable  
 MATRIZ Agua para uso y consumo humano  
 ENSAYO Recuento de Coliformes Totales por filtración de membrana  
 NORMA O REFERENCIA SMEWW-APHA-AWWA-WEF Membrane Filter Technique for Members of the Coliform Group. Standard Total Coliform Membrane Filter Procedure Part 9222 B. 22nd Ed. 2012

#### DATOS GENERALES:

MUESTRA DE CONTROL: Agua Potable **CEPA INOCULADA:** Escherichia coli (ATCC 25922)

Inóculo: ufc/ 100 ml	18	Vol. muestra control (ml)	1000
----------------------	----	---------------------------	------

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS								
Datos del Analista Evaluado								
Ensayo	Dilución	UFC/100ml	Log	Ensayo	Dilución	UFC/100ml	Log	Promedio
1	m.o.	21	1.3222	5	m.o.	12	1.0792	1.2221
2	m.o.	18	1.2553	6	m.o.	17	1.2304	
3	m.o.	15	1.1781	7	m.o.	16	1.2041	
4	m.o.	17	1.2304	8	m.o.	19	1.2788	

m.o. = muestra original

#### 1. Precisión

Desviación Estándar	RSD	"r" = RSD x 2,8
0.0730	0.0598	0.1673
REPETIBILIDAD		Criterio de Aceptación: "r%" < 30%
"r" (%)	Valor teórico límite (%)	Calificación
16.73	30	Conforme

DISPERSION DE POISSON (D <sup>2</sup> )			Criterio de Aceptación: D2 ≤ 3.84	
Resultado mayor	Resultado menor	D <sup>2</sup>	Valor límite	Calificación
21	12	2.45	3.84	Conforme

#### 2. Veracidad (confiabilidad estadística)

Resultado del Referente	Resultados del Evaluado	INTERVALO AL 95% CONFIANZA			CONCLUSIÓN
		c - 2√c	↔	c + 2√c	
18	21	10.70	↔	28.40	CONFORME
	18				
	15				
	17				
	12				
	17				
	16				
	19				

#### Declaración:

Evaluados los parametros establecidos para competencia tecnica del analista se AUTORIZA a :

**XTOPHER QUISPE JURADO** para la ejecución en todas sus etapas, incluyendo la lectura de resultados del método

Recuento de Coliformes Totales por filtración de membrana en la matriz Agua para uso y consumo humano

desde la emisión del presente documento.

Anexo 7. Resultados de la Prueba de Aptitud para Agua Potable.



WATER MICRO-16/04/2019

Lab Code: 21181

Round 4

(Final)

Concise Data Summary

WMP - Micro: Potable Water

Test	Report No.	Sample 1 WMP1904-1		Sample 2 WMP1904-2	
		Rating	ND	Rating	ND
E. coli MPN (MPN/100ml)	1	OK	-0.54	Good	-0.47
Faecal Colif MPN (MPN/100ml)	1	Good	-0.33	Good	-0.19
HPC 35°C [Aus Std](cfu/ml)	1	Good	0.39	OK	0.56
Total Coliform (cfu/100ml)	1	Good	-0.09	Good	-0.44
Total Colif MPN (MPN/100ml)	1	OK	-0.52	Good	-0.49

**Key**

ND = Normalised Difference (Result - Median) / Limit

Good = Your result has a Normalised Difference of < 0.5

OK = Your result has a Normalised Difference of ≥ 0.5 and < 1

Warning = Your result has a Normalised Difference of ≥ 1 and < 1.5

Action = Your result is ≥ 1.5 normalised differences from the central value (Recommend investigation)

WD = Withdrawn

**Anexo 8.** Tamaño Relativo de Huevos de Helmintos.



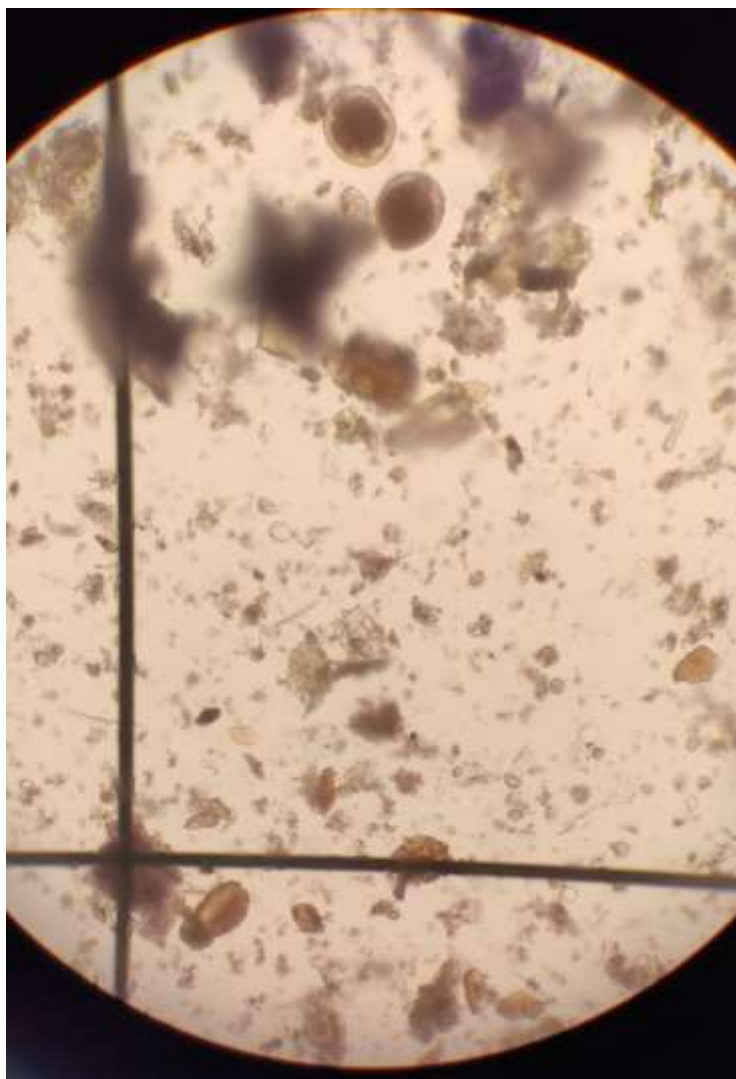
**FUENTE:** Figura obtenida del Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de los Parásitos Intestinales del Hombre del Instituto Nacional de Salud.



**Anexo 9.** Material Utilizado para el Análisis de Huevos de Helmintos.



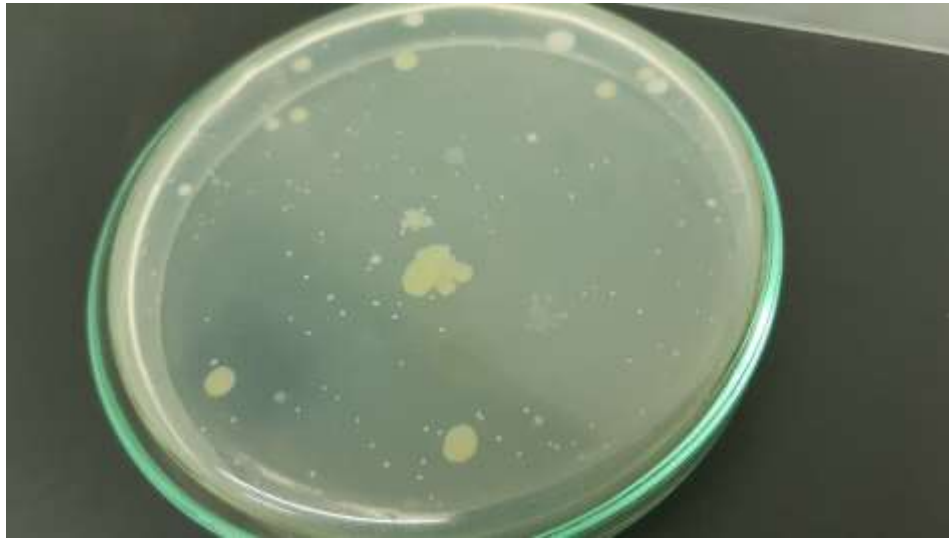
**Anexo 10.** Fotografía de Huevos de *Ascaris Lumbricoides* y *Toxocara sp.*



**Anexo 11.** Incubación de Placas para Recuento de Mesófilos Aerobios en Agar PCA.



**Anexo 12.** Colonias de Mesófilos Aerobios en Placa con Agar PCA.



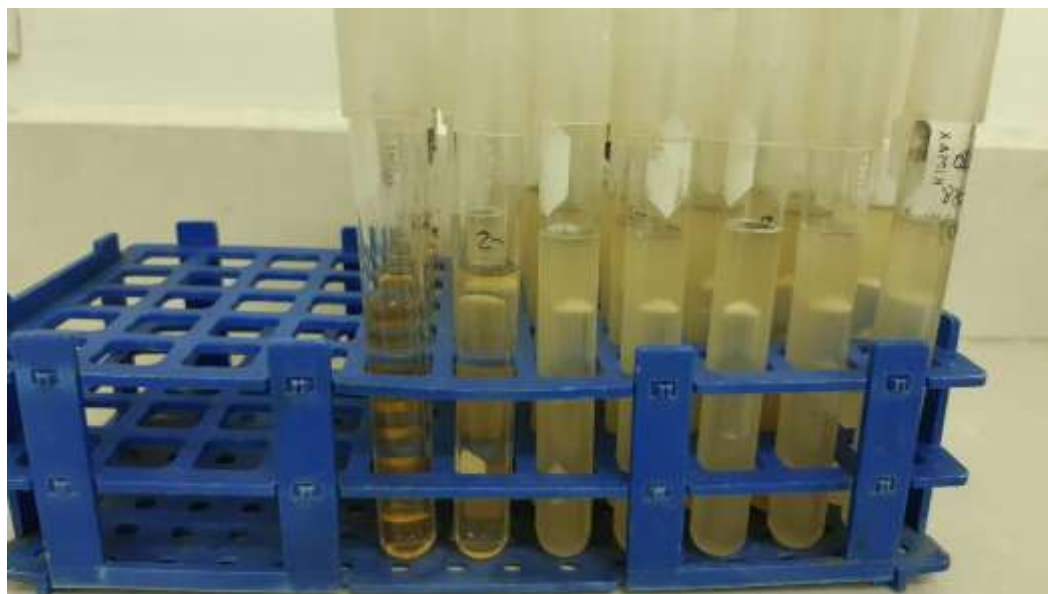
**Anexo 13.** Filtración de la Muestra de Agua Residual Industrial.



**Anexo 14.** Evaluación de Caldo Lauril Sulfato Triptosa para Enumeración de *E.coli*



**Anexo 15.** Tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptosa con Producción de gas.



**Anexo 16.** Incubación de Caldo EC para Enumeración de *E.coli*.

