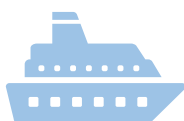
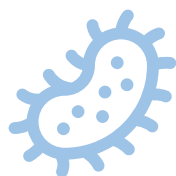




Verificación de métodos de
ensayos microbiológicos
para el ejercicio de la
autoridad



Introducción

Los laboratorios de ensayo deben contar con mecanismos que le permitan seleccionar los métodos ya sean normalizados, no normalizados o desarrollados por el laboratorio de acuerdo con las actividades que este desarrolla y el fin de su implementación.

Una vez seleccionado el método, debe cursar una verificación que consiste en suministrar evidencia objetiva de que este satisface los requisitos especificados, a través de una serie de repeticiones cuyo objetivo es confirmar que el método genera resultados confiables bajo las condiciones de trabajo disponibles en el laboratorio.

En esta vía, el Laboratorio de Dimar sede Pacífico implementó tres técnicas microbiológicas que permiten determinar las bacterias *Escherichia coli*, Enterococos intestinales y *Vibrio* spp en agua de mar, en alineación con el artículo 6 de la Resolución Nacional 0477 del 2012, para el control y verificación de la gestión del agua de lastre en Colombia y la entrada en vigor del Convenio sobre la Gestión del agua de lastre.

Estos métodos de ensayo fueron verificados acorde con el numeral 7.2 de la Norma técnica ISO/IEC 17025:2017, por lo que fue necesario contar con evidencia objetiva tanto del método (para lo cual se trabaja sobre muestras naturales y muestras naturales fortificadas), como del sistema instrumental (para lo cual se trabaja sobre soluciones patrón o blancos fortificados); generando información cuantitativa de los atributos analíticos y de desempeño del método aplicado para su alcance y uso establecido.

Cada sede del laboratorio de la Dirección General Marítima valida o verifica los métodos de manera que se pueda definir si son aptos para el fin previsto, antes de ser usados en los ensayos, documentando y almacenando debidamente todos los registros técnicos y administrativos asociados al proceso de validación o verificación de métodos de ensayo.

Estas verificaciones deben desarrollarse con una frecuencia que permita corroborar que el método sigue siendo apto aun si se presenta algún cambio de personal, reactivos, equipamiento o instalaciones.

Metodología

Se llevo a cabo la verificación de tres métodos de ensayo microbiológicos de interés para el ejercicio de la autoridad en términos del control del agua de lastre, así:

1. Método 9222 J Procedimiento estándar de filtración por membrana para *Escherichia coli* usando Caldo m-colibblue24.
2. Método para la detección y enumeración de Enterococos intestinales UNE-ISO 7899-2-2000 por filtración por membrana.
3. Método 9278 H (modificado) para la determinación de la bacteria patógena *Vibrio* spp.



La planeación de los ensayos de verificación se realizó de acuerdo con el plan establecido en el Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio de la Dimar, siguiendo el formato M5-00-FOR-064 Plan de selección, validación o verificación de método de ensayo. Este plan incluyó el objetivo, alcance, características del método de referencia implementado, aseguramiento y controles de calidad del método, parámetros de verificación, materiales, insumos, equipos e instrumentos a emplear, patrones, reactivos y material de referencia a emplear, diseño experimental, responsables de la verificación entre otras.

En el diseño experimental se tuvo en cuenta cuatro matrices:

1. Agua de mar
2. Agua de mar con adición del microorganismo diana en concentración alta
3. Agua de mar con adición del microorganismo diana en concentración media
4. Agua de mar con adición del microorganismo diana en concentración baja

Estas cuatro matrices se analizaron para cada uno de los microorganismos, con 15 repeticiones ejecutadas por dos analistas, con el fin de determinar atributos como la precisión intermedia entre analistas y la repetibilidad del método. En total se procesaron y analizaron 360 muestras, así como demás controles como parte del aseguramiento de la calidad de los ensayos microbiológicos.

Los *atributos analíticos* calculados fueron: repetibilidad, precisión intermedia, criterio de precisión, límite de detección, incertidumbre global y las características de desempeño como sensibilidad, especificidad, tasa de falsos positivos, tasa de falsos negativos, selectividad y eficiencia. Para el caso particular de *Vibrio* spp, solo fueron calculados las características de desempeño dado que el método es cualitativo y los demás atributos solo aplican para métodos cuantitativos.



Resultados

Los resultados para cada método de ensayo fueron registrados en el formato M5-00-FOR-065 Informe de selección, validación o verificación de método de ensayo; en total se generaron tres informes condensados en el presente documento.

Para obtener cada dato y calcular cada uno de los atributos analíticos fue necesario realizar conteos de las 360 repeticiones realizadas, es decir, 360 cajas de Petri cada una con aproximadamente 300 unidades formadoras de colonias UFC según la concentración procesada (Figura 1).



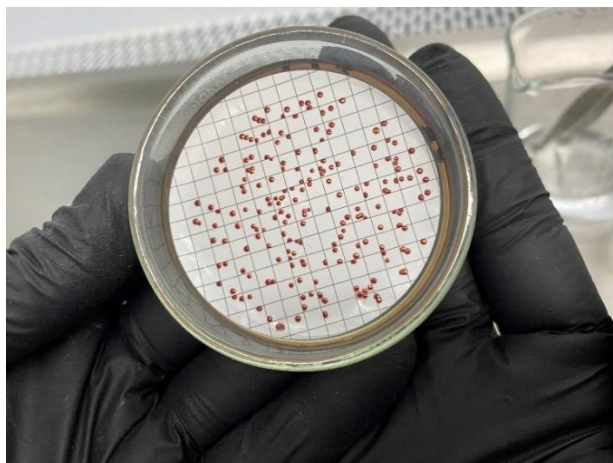


Figura 1. Recuento de *Enterococos* intestinales en agua de mar. Nota: cada punto corresponde a una UFC o colonia.

Repetibilidad y precisión intermedia

La repetibilidad es la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas, bajo las cuales se obtienen resultados independientes de una prueba con el mismo método, con los mismos equipos, en el mismo laboratorio y analista.

Se calculó la sobredispersión aplicando el modelo de Poisson y se calculó la varianza operacional relativa y el ji-cuadrado, el cual fue comparado con los valores críticos para la serie de datos trabajados.

En los tres métodos de ensayo se determinó que no existió una sobredispersión de los datos según la distribución de Poisson, con un nivel de confianza del 0,05.

La precisión intermedia es una medida indirecta de la reproducibilidad intralaboratorio cuyo objetivo es determinar la proximidad de concordancia bajo condiciones que se cambian. Para determinar este atributo, se calculó la varianza operacional basada en el promedio y la varianza. Finalmente, para determinar el desempeño del método sobre el material de prueba, se calculó el porcentaje de relación entre la repetibilidad y la reproducibilidad mediante la siguiente ecuación:

$$\%R\&R = \sqrt{(\% \text{ Repetibilidad})^2 + (\% \text{ Reproducibilidad})^2}$$

Si $\%R\&R < 10\%$ el sistema de medición es aceptable.

Si $10\% \leq \%R\&R < 30\%$ el sistema de medición puede ser aceptable según su uso, aplicación.

Si $\%R\&R > 30\%$ el sistema de medición es considerado como no aceptable y requiere de mejoras en cuanto al operador, equipo, método, condiciones, etc.

En promedio, los resultados obtenidos para cada método de ensayo fueron los siguientes:



Escherichia coli

	Agua de Mar + <i>E. coli</i> Concentración media	
	Analista 1	Analista 2
%Repetibilidad	110	105
%Reproducibilidad	133	133
%Relación	16	15

Enterococos intestinales

	Agua de Mar + <i>E. faecalis</i> Concentración media	
	Analista 1	Analista 2
%Repetibilidad	60	132
%Reproducibilidad	106	106
%Relación	13	15

Criterio de precisión

Este criterio se calculó para los métodos cuantitativos por filtración de membrana; se calculó la precisión de los recuentos duplicados siguiendo el procedimiento establecido en el SM ED24 9020 B 9c. Posteriormente, el 10% de las muestras procesadas durante el 2023 en el área de microbiología, fueron evaluadas con relación al cumplimiento de este criterio obteniendo resultados satisfactorios como se muestra en la siguiente tabla. Dicho cumplimiento se registra en el formato M5-00-FOR-057 Duplicados y precisión de métodos cuantitativos.

Análisis del criterio de precisión con el 10% de las muestras por duplicado										
AAAA-MM-DD	N° DE DUPLICADO	CÓDIGO MUESTRA	ANÁLISIS DUPLICADO		LOGARITMO (Log10)		Rlog (L1-L2)	CUMPLIMIENTO DEL CRITERIO DE PRECISIÓN	ANALISTA	OBSERVACIONES
yyyy-mm-dd	N° of duplicate	Sample code	D1	D2	L1	L2				
2023-07-17	1	SP-23-0192	2	2	0,30103	0,301029996	0	Cumple	JP	Ninguna
	2	SP-23-0195	3	3	0,47712125	0,477121255	0	Cumple	JP	Ninguna
	3	SP-23-0198	11	11	1,04139269	1,041392685	0	Cumple	JP	Ninguna
	4	SP-23-0201	19	16	1,2787536	1,204119983	0,074633618	Cumple	JP	Ninguna
	5	SP-23-0204	17	19	1,23044892	1,278753601	0,04830468	Cumple	JP	Ninguna
	6	SP-23-0207	4	5	0,60205999	0,698970004	0,096910013	Cumple	JP	Ninguna
	7	SP-23-0210	1	1	0	0	0	Cumple	JP	Ninguna
	8	SP-23-0213	1	1	0	0	0	Cumple	JP	Ninguna
	9	SP-23-0216	1	1	0	0	0	Cumple	JP	Ninguna
* Para calcular los logaritmos: si es <1 se coloca 1; si es >200 se coloca 200								APROBADO POR		
								Approved by		
										
								Jefe de Laboratorio		
								Laboratory head		

Figura 2. Cumplimiento de los resultados microbiológicos para la bacteria *Escherichia coli* generados durante el 2023 evaluado frente al criterio de precisión calculado.



Análisis del criterio de precisión con el 10% de las muestras por duplicado										
AAAA-MM-DD	N° DE DUPLICADO	CÓDIGO MUESTRA	ANÁLISIS DUPLICADO		LOGARITMO (Log10)		Rlog (L1-L2)	CUMPLIMIENTO DEL CRITERIO DE PRECISIÓN	ANALISTA	OBSERVACIONES
yyyy-mm-dd	N° de duplicado	Sample code	D1	D2	L1	L2				
2023-07-17	1	SP-23-0192	13	15	1,11394335	1,176091259	0,062147907	Cumple	JP	Ninguna
	2	SP-23-0195	12	11	1,07918125	1,041392685	0,037788561	Cumple	JP	Ninguna
	3	SP-23-0198	49	52	1,69019608	1,716003344	0,025807264	Cumple	JP	Ninguna
	4	SP-23-0201	51	55	1,70757018	1,740362689	0,032792513	Cumple	JP	Ninguna
	5	SP-23-0204	34	38	1,53147892	1,579783597	0,04830468	Cumple	JP	Ninguna
	6	SP-23-0207	18	14	1,25527251	1,146128036	0,109144469	Cumple	JP	Ninguna
	7	SP-23-0210	107	89	2,02938378	1,949390007	0,079993771	Cumple	JP	Ninguna
	8	SP-23-0213	43	32	1,63346846	1,505149978	0,128318477	Cumple	JP	Ninguna
	9	SP-23-0216	1	1	0	0	0	Cumple	JP	Ninguna
* Para calcular los logaritmos: si es <1 se coloca 1; si es >200 se coloca 200								APROBADO POR		
								Approved by		
										
								Jefe de Laboratorio		
								Laboratory head		

Figura 3. Cumplimiento de los resultados microbiológicos para la bacteria *Enterococos intestinales* generados durante el 2023 evaluado frente al criterio de precisión calculado.

El *límite de detección*, así como la *incertidumbre global* de cada método de ensayo fue calculada siguiendo los procedimientos establecidos por el Laboratorio de Dimar; el límite de detección correspondió a la mínima cantidad de microorganismo diana que puede ser detectada por el método implementado; la incertidumbre global fue calculada basada en la reproducibilidad entre analistas, dado que es quien aporta mayoritariamente a este atributo en los ensayos microbiológicos.

Características de desempeño

La confirmación bioquímica consistió en la utilización de diferentes agares o medios de cultivo que contienen ingredientes que permiten resaltar las características bioquímicas típicas de los microorganismos en estudio. Esto nos permite identificar correctamente las colonias típicas de las bacterias diana e identificar cuales no son típicas y deben ser descartadas del conteo.

Esto permitió determinar la tasa de falsos positivos o falsos negativos identificados por el analista, aunado a la sensibilidad, especificidad y selectividad del método.

Para determinar este atributo, se tomaron tres colonias típicas y tres atípicas del microorganismo diana detectado en una muestra de agua de mar natural. Cada Unidad Formadora de Colonia (UFC) fue transferida a un tubo que contenía caldo triptófano y otro tubo con agar citrato e incubadas a una temperatura específica. En total fueron transferidas 180 colonias para el método 9222 J (colonias presuntivas de *Escherichia coli*). Los resultados obtenidos permitieron identificar las colonias asignadas correctamente como típicas y atípicas, así como el desempeño del método en esta diferenciación.

Los resultados para el método de *Escherichia coli* se presentan en la siguiente tabla:



Tabla 1. Características de rendimiento del método 9222J para la determinación de *Escherichia coli*.

Características de rendimiento	
Sensibilidad	100%
Especificidad	50%
Tasa de falsos positivos	36%
Tasa de falsos negativos	0%
Selectividad	48%
Eficiencia	74%

Para confirmar las colonias presuntivas de la bacteria *Enterococos* intestinales, se tomó el filtro de membrana como se muestra en la figura 4 y se transfirió a un agar que permitió confirmar la hidrólisis de la esculina, es decir, el precipitado negro de cada colonia para ajustar el conteo (ver figura 5).

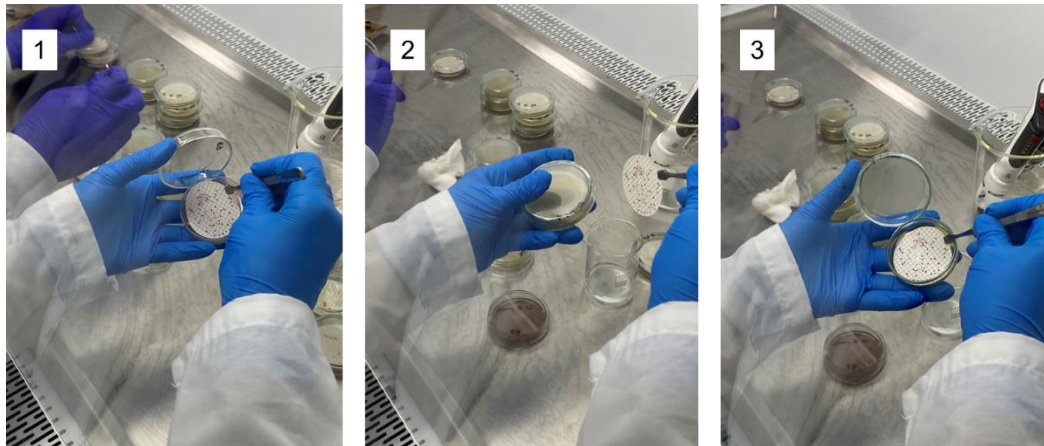


Figura 4. Transferencia del filtro de membrana con colonias presuntivas de *Enterococos* intestinales.



Figura 5. Hidrólisis de la esculina en agar Bilis por *Enterococos* intestinales.



Esta actividad se realizó 30 con el fin de obtener las características de rendimiento del método descritas en la tabla 2.

Tabla 2. Características de rendimiento del método de ensayo UNE-ISO 7899-2 para la determinación de *Enterococos* intestinales.

Características de rendimiento	
Sensibilidad	100%
Especificidad	50%
Tasa de falsos positivos	14%
Tasa de falsos negativos	0%
Selectividad	76%
Eficiencia	88%

El método para la determinación de *Vibrio* spp basado en el Standard Methods ED24, es un método cualitativo por lo que solo fueron calculadas las características de rendimiento dado que los demás atributos corresponden a método cuantitativos. Los resultados se registran en la tabla 3.

Tabla 3. Características de rendimiento del método de ensayo 9278H modificado para la determinación de *Vibrio* spp.

Características de rendimiento	
Sensibilidad	100%
Especificidad	50%
Tasa de falsos positivos	62%
Tasa de falsos negativos	0%
Selectividad	24%
Eficiencia	62%

Conclusiones

Los atributos evaluados relacionados con la repetibilidad, la precisión intermedia el criterio de precisión, el límite de detección, así como las características de rendimiento y la relación entre la precisión intermedia y la repetibilidad, aplicando el método 9222 J, referente al Procedimiento Estándar de Filtración por Membrana para *Escherichia coli* usando Caldo m-Colibblue24 del Standard Methods 24RD, demostraron que el método bajo las condiciones del laboratorio fue confiable, repetible y reproducible y por ende es adecuado para su aplicabilidad, en los diferentes niveles de dilución para la determinación de esta bacteria en aguas marinas.

Los atributos evaluados relacionados con la repetibilidad, la precisión intermedia el criterio de precisión, el límite de detección, así como las características de rendimiento y la relación entre la precisión intermedia y la repetibilidad, aplicando el método para la detección y enumeración de *Enterococos* intestinales UNE-ISO 7899-2 2000 por Filtración



por Membrana, demostraron que el método bajo las condiciones del laboratorio fue confiable, repetible y reproducible y por ende es adecuado para su aplicabilidad en los diferentes niveles de dilución para la determinación de esta bacteria en aguas marinas.

El método para el aislamiento e identificación de *Vibrio* spp obtuvo resultados satisfactorios en cuanto a la sensibilidad y especificidad, lo que indica que los medios de cultivo empleados fueron adecuados para el aislamiento de las bacterias objeto del estudio, dado que permitieron su crecimiento, supliendo las necesidades nutricionales básicas de los microorganismos. Por el contrario, el porcentaje de la tasa de falsos positivos fue del 62%, por lo que se recomienda implementar pruebas bioquímicas que permitan identificar acertadamente la presencia o no de la bacteria de estudio. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se concluye que el método empleado para la determinación e identificación de *Vibrio* spp es sensible, selectivo y eficiente para la determinación del microorganismo diana.

La frecuencia relacionada con la verificación de los métodos de ensayo implementados es definida por el laboratorio y dependerá de los cambios (equipamiento, reactivos, personal, entre otros) que se presenten que puedan afectar el desempeño del método.

Bibliografía

- AENOR. Asociación Española de Normalización y certificación. UNE –EN ISO7899-2:2000. Norma Española. Calidad del agua. Detección y recuento de Enterococos intestinales. Parte 2: Método de filtración de membrana.
- American Public Health Association - APHA, American Water Works Association - AWWA, Water Environment Federation - WEF. (2023). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 24 TH Edition. American Public Health Association. Pag 1161-1162. 9222 J. Simultaneous Detection of Total Coliform and *E. coli* by Dual-Chromogen Membrane Filter.
- American Public Health Association - APHA, American Water Works Association - AWWA, Water Environment Federation - WEF. (2023). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 24 TH Edition. American Public Health Association. 9278. Intralaboratory Quality Control Guidelines.
- ICONTEC (diciembre de 2017). NTC-ISO/IEC17025:2017. Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC17025:2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Bogotá D.C.
- M5-00-PRO-026 Procedimiento selección, validación o verificación de métodos de ensayo y cálculo de la incertidumbre de la medición.

