

“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

ORGANISMO NACIONAL DE SANIDAD PESQUERA Y ACUÍCOLA
PROGRAMA INTERLABORATORIO
“ENUMERACIÓN DE ESCHERICHIA COLI (NMP)
2020-IV”
INFORME FINAL

Fecha de emisión: 2020/12/14

Datos de Contacto

Proveedor: Coordinación de Ensayos de Aptitud – SANIPES

Persona de Contacto: Coordinador de Ensayos de Aptitud

Correo electrónico: Interlaboratorios@sanipes.gob.pe

Teléfono: (511) 213-8570 Anexo 8008.

Web: www.sanipes.gob.pe

Autorizado por:




Dra. Mercedes Govea Requena

Directora

**Dirección Sanitaria y de Normatividad
Pesquera y Acuícola**

Revisado por:



Blgo. Eduard Manuel Villalobos Infante



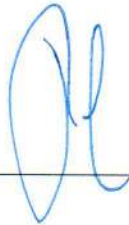

**Coordinador de Ensayos de Aptitud
Dirección Sanitaria y de Normatividad
Pesquera y Acuícola**

Página 1 de 12



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

DATOS DEL EQUIPO TÉCNICO:

Colaborador	Formación	Función	Firma
Eduard Manuel Villalobos Infante	Biólogo Microbiólogo	Coordinador de Ensayos de Aptitud	 
Christian Rebatta Quintanilla	Biólogo	Responsable Técnico de Ensayos de Aptitud	 



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

INDICE

1.	Introducción	4
2.	Declaración de Confidencialidad e Imparcialidad	5
3.	Procedimiento	5
4.	Ítem de Ensayo	5
4.1	Preparación de los Ítems de Ensayo.....	5
4.2	Homogeneidad	6
4.3	Estabilidad	6
4.4	Distribución y Transporte.....	7
4.5	Contenido de los Ítem de Ensayo o Resultados Esperados	7
5.	Análisis Estadístico	8
6.	Resultados.....	10
7.	Comentarios	11
8.	Anexos.....	12



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

1. Introducción

El Organismo Nacional de Sanidad Pesquera-SANIPES implementa, a través de la Dirección Sanitaria y de Normatividad Pesquera y Acuícola, el Programa de Ensayos Interlaboratorios dirigidos a su Red de laboratorios autorizados, las cuales participan en los Controles Oficiales y Certificación Sanitaria del sector pesquero y acuícola; programa que permite evaluar los resultados en los ensayos realizados con matrices hidrobiológicas, y así demostrar la confiabilidad y competencia técnica.

Las Pruebas Interlaboratorios son una herramienta técnica necesaria para implementar un sistema de monitoreo con el fin de vigilar el cumplimiento de los estándares de calidad en los ensayos que se ejecutan en la Red de laboratorios, fortaleciendo el rol del SANIPES y brindando confianza a los consumidores del mercado nacional o extranjero, así como a las autoridades sanitarias extranjeras.

El SANIPES continuando con su programa de Interlaboratorios, organizó, la ronda “Enumeración de *Escherichia coli* (NMP)” en matriz pescado congelado, ensayo usado en los Controles oficiales y Certificación Sanitaria del sector pesquero y acuícola y en algunos requisitos sanitarios de productos hidrobiológicos.

Escherichia coli es un miembro de la familia de las Enterobacteriaceae, que abarca muchos géneros la cual incluye patógeno conocidos tales como Salmonela, Shigella, y Yersinia. *E. coli* tiene la capacidad de fermenta la glucosa y se distribuye extensamente en el intestino de seres humanos y animales de sangre caliente, es el anaerobio facultativo predominante en el intestino y la parte de la flora intestinal esencial que mantiene la fisiología del hospedero sano.

E. coli es abundante en heces humanas y animales y generalmente no hallada en otros ambientes, lo que le confiere ser un excelente indicador de contaminación fecal, por lo tanto, la presencia de *E. coli* en alimento o agua es un indicador de reciente contaminación fecal y posible presencia de bastos patógenos.

Para el desarrollo del Interlaboratorio de “Enumeración de *Escherichia coli* (NMP)”, se empleó como cepa de interés *Escherichia coli* ATCC 25922. Este Interlaboratorio fue realizado en cumplimiento a los requisitos de la norma ISO/IEC 17043:2010 “Evaluación de la conformidad - Requisitos generales para los ensayos de aptitud” y la NTP ISO/IEC 17025:2017 “Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración”. El diseño estadístico se realizó en el marco de la ISO 13528:2015 (Pruebas de Homogeneidad y Estabilidad) “Métodos estadísticos para su uso en pruebas de competencia por comparación entre laboratorios. El personal encargado del proceso interlaboratorios, es personal calificado, el cual aseguró la imparcialidad y objetividad en la obtención de los resultados.

Los diseños estadísticos estuvieron basados en las hipótesis, los errores, la naturaleza de datos y el número esperado de resultados. Los criterios de aceptación establecidos en la evaluación de la calidad



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

del ensayo Interlaboratorio aseguraron que cada participante reciba ítems de ensayo comparable y estable durante el desarrollo del Interlaboratorio.

El presente informe detalla la información sobre los resultados de los laboratorios participantes, la evaluación de los datos y su desempeño en el Interlaboratorio para la “Enumeración de *Escherichia coli* (NMP)”, desarrollado por la Coordinación de Ensayos de Aptitud de SANIPES en referencia de la ISO/IEC 17043:2010.

2. Declaración de Confidencialidad e Imparcialidad

Los participantes del ensayo Interlaboratorio “Enumeración de *Escherichia coli* (NMP)”, recibieron un código para su identificación, el cual es únicamente de conocimiento para las personas involucradas en la ejecución del Interlaboratorio, de conformidad a la política de la Coordinación de Ensayos de Aptitud – SANIPES de mantener la confidencialidad en los resultados obtenidos, en marco del cumplimiento de la norma ISO/IEC 17043:2010.

Los resultados del ensayo Interlaboratorio serán comunicados a los participantes mediante correo electrónico u oficio y publicados en la página web institucional. Si los resultados fueran no satisfactorios y/o cuestionables, se informará al participante, y se procederá a una posterior comunicación al área de Auditorías Sanitarias para que se realice el seguimiento según los procedimientos competentes vigentes.

3. Procedimiento

La información sobre el diseño del Ensayo de Aptitud “Enumeración de *Escherichia coli* (NMP)”, se encuentra detallado en el Anexo 01.

4. Ítems de Ensayo

4.1. Preparación de los Ítems de Ensayo

Los ítems de ensayo de éste Interlaboratorio fueron preparados por la Coordinación de Ensayos de Aptitud de SANIPES, en condiciones controladas, usando equipos calibrados, material de referencia certificado y materia prima seleccionada para la preparación de las matrices.

Matriz

Se distribuyó 20 gramos de pescado congelado (“Perico”: *Coryphaena hippurus*) en bolsas estériles debidamente selladas en condiciones asépticas. Se verificó previamente a la distribución, que el mecanismo de sellado prevenga la contaminación y que la matriz no contenga los microorganismos de interés de esta ronda.



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

Material Liofilizado

Para la preparación del ítem de ensayo se utilizó como microorganismos de interés con Número de Lote liofilizado 8202010 de fecha 2020/10/22, cultivo liofilizado de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Se envió un (1) vial de vidrio sellado con precinto de aluminio, conteniendo una suspensión microbiana liofilizada del microorganismo anteriormente descrito

4.2. Homogeneidad

De cada lote preparado se seleccionaron aleatoriamente 10 ítems de ensayo y se analizaron por duplicado según lo recomendado por la norma ISO 13528: 2015.

Para validar la homogeneidad del ítem de ensayo se realizó por duplicado el ensayo de Enumeración de *Escherichia coli*, ISO 16649-3:2015/Corrected version 2016. Microbiology of the food chain-Horizontal Method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 3: Detection and most probable number technique using 5-Bromo-4-chloro3-indolyl- β -D-glucuronide

Los datos fueron evaluados con el Test de Cochran para la evaluación de la variación de los recuentos y sus réplicas obtenidos al azar, luego se realizó un análisis de varianza (ANOVA) p-valor=0.35, posteriormente se realizó el test de comparación de medias según la ISO 13528 (Desviación estándar de la “diana” (σ_{pt}) = 0.899).

Criterio de homogeneidad: $S_s \leq 0.3 \sigma_{pt}$
Resultado de la Homogeneidad $S_s=0.100$

4.3. Estabilidad

Los estudios de estabilidad de los ítems de ensayo enviados fueron desarrollados con la metodología Enumeración de *Escherichia coli*, ISO 16649-3:2015/Corrected version 2016. Microbiology of the food chain-Horizontal Method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 3: Detection and most probable number technique using 5-Bromo-4-chloro3-indolyl- β -D-glucuronide, durante el periodo establecido, a fin de asegurar que los ítems de ensayo preparados no sufran alteraciones, garantizando su estabilidad durante este periodo.

Para garantizar la estabilidad se analizó 3 ítems de ensayo por duplicado, seleccionados aleatoriamente del lote preparado (ISO 13528: 2015) y se evaluó su estabilidad durante 3 períodos de tiempo diferentes (dentro del plazo de ensayo establecido).

“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

Los datos fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) p-valor=0.0052, respecto a los datos de homogeneidad. Se realizó el test de comparación de medias según la ISO 13528 (Desviación estándar de la “diana” (σ_{pt}) = 0.899).

Criterio de estabilidad: $| \text{Media de Homogeneidad} - \text{Media de estabilidad (día)} | \leq 0.3 \sigma_{pt}$

Resultado de la estabilidad:

- Primera evaluación: $0.11 < 0.27$
- Segunda evaluación: $0.19 < 0.27$
- Tercera evaluación $0.19 < 0.27$.

4.4. Distribución y Transporte

Para la “Enumeración de *Escherichia coli* (NMP)”, cada laboratorio participante recibió 1 (una) bolsa conteniendo 20 g de matriz pescado congelado y 1 (un) vial con Liofilizado para la fortificación de la matriz, ambos sellados e identificado con etiquetas impermeables.

Los laboratorios participantes fueron codificados según los Códigos: S-001, S-002, S-003, S-004, S-006, S-008, S-009, S-010, S-011 y S-014.

El material fue acondicionado en cajas térmicas con geles refrigerantes para mantener la temperatura hasta la llegada a los laboratorios. Los ítems de ensayo del presente Interlaboratorio fueron recogidos por los participantes en las instalaciones del SANIPES - Sede Callao, el 26 de octubre del 2020, las instrucciones del Interlaboratorio fueron entregadas junto con los ítems de ensayo.

NOTA 1: CEA-SANIPES no se responsabilizó por la estabilidad y homogeneidad de los ítems de ensayo, si estos se analizan fuera del tiempo establecido en las instrucciones.

4.5. Contenido de los ítems de ensayo o resultados esperados

Tabla N°01. Resultados esperados

Identificación	Valor esperado (Moda)	Rango esperado	Microorganismos de Interés
Enumeración de E.coli CEA-SANIPES 2020-IV	330	110-1000	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922



5. Análisis Estadístico

El objetivo del tratamiento estadístico es obtener un resultado simple y transparente, de fácil comprensión para los laboratorios participantes, realizándose los siguientes pasos:

- **Eliminación previa de laboratorios**

Se realiza una eliminación de laboratorios que proporcionan resultados que no cumplen las instrucciones solicitadas, y de aquellos que informan resultados no numéricos, falsos positivos o falsos negativos.

- **Conversión logarítmica**

Para recuentos semi-cuantitativos microbiológicos, es necesario una conversión logarítmica (\log_{10}) de los resultados, permitiendo con ello obtener una distribución normal de resultados. (Para los resultados “0” se considera “1” para poner obtener un valor de “0” en escala logarítmica y poder así hacer el tratamiento estadístico y luego calcular la media (X) y desviación estándar (S) para cada laboratorio.

- **Eliminación de resultados incongruentes**

Inicialmente se eliminan aquellos valores medios que se consideran significativamente diferentes del resto de la población, aplicándose los siguientes criterios:

-Eliminación de resultados por aplicación del **test de la Mediana**, con ello se elimina los valores medios de los laboratorios, que se encuentran fuera del rango de 50% del valor de la mediana de la totalidad de los resultados.

-Eliminación de resultados por aplicación del **test estadístico de Cochran** para detectar laboratorios que presentan una variabilidad intra-laboratorio significativamente mayor que el resto de laboratorios.

-Eliminación de resultados por aplicación del **test de la función de densidad de Kernel** para asegurar así la distribución normal de los resultados.

- **Valor asignado**

El método empleado para la determinación del valor asignado consiste en la estimación del valor consenso entre los laboratorios participantes, obtenido como la media robusta (X^*) de todos los resultados aceptados, calculada junto con la desviación estándar robusta (S^*) mediante métodos estadísticos robustos que permiten minimizar la influencia de “outliers” (ISO 13528).



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

- **Desviación estándar “diana” o adecuada al fin pretendido (σ_{pt})**

La desviación estándar “diana” define la escala de variación aceptable entre los laboratorios para cada ensayo. Para el cálculo de este valor se usó la referencia de otros organizadores de Interlaboratorios seleccionando el siguiente valor: $\sigma_{pt} = 0.899$.

- **Incertidumbre del valor asignado**

La incertidumbre del valor asignado (μ_x) es calculada a partir del número de laboratorios aceptados (n), y de la desviación estándar robusta (S^*) como:

$$\mu_x = 1.23x \frac{S^*}{\sqrt{n}}$$

Donde:

μ_x : Incertidumbre del valor asignado

S^* : Desviación estándar robusta

n : Número de laboratorios.

- **Criterios y Evaluación del desempeño**

Para evaluar la eficacia de los participantes en cada uno de los parámetros estudiados, se emplea el criterio Z, de acuerdo con la ecuación:

$$Z = \frac{x - X}{\sigma_{pt}}$$

Dónde:

x : Valor medio de los resultados de un laboratorio

X : Valor asignado

σ_{pt} : S “diana”

Al aumentar la desviación del resultado, aumenta el valor absoluto de Z, pudiendo ser por exceso o por defecto (según el signo de Z).

Los valores de las Z se interpretan del modo siguiente:

$|Z| \leq 2$ “Satisfactorio”

$2 < |Z| < 3$ “Cuestionable”

$|Z| \geq 3$ “Insatisfactorio”

“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
 “Año de la Universalización de la Salud”

6. Resultados

Los resultados de los participantes fueron reportados a través del correo interlaboratorios@sanipes.gob.pe, teniendo como fecha máxima de recepción el 05 de noviembre de 2020, estos se presentan en la Tabla N°02 y tabla N°3

Tabla N°02. Resultados cualitativos individuales de los participantes de “Enumeración de *Escherichia coli* (NMP), en matriz pescado congelado para todos los participantes.

Código	PARÁMETRO								
	(ufc/100mL)/(NMP/100mL)		Log X ₁	Log X ₂	X	S	INTERVALO		Z-SCORE
	X1	X2							
S-001	920	540	2.964	2.732	2.848	0.164	2.684	3.012	0.1
S-002	490	460	2.690	2.663	2.676	0.019	2.657	2.696	-0.1
S-003	460	220	2.663	2.342	2.503	0.227	2.276	2.729	-0.3
S-004	1100	460	3.041	2.663	2.852	0.268	2.584	3.120	0.1
S-006	430	430	2.633	2.633	2.633	0.000	2.633	2.633	-0.2
S-008	490	700	2.690	2.845	2.768	0.110	2.658	2.877	0.0
S-009	350	350	2.544	2.544	2.544	0.000	2.544	2.544	-0.3
S-010	540	350	2.732	2.544	2.638	0.133	2.505	2.771	-0.1
S-011	1300	1300	3.114	3.114	3.114	0.000	3.114	3.114	0.4
S-014	2300	1500	3.362	3.176	3.269	0.131	3.138	3.400	0.6

ELIMINADOS

Test Mediana:	ninguno
Test Cochran:	ninguno
Test Kernel:	ninguno

N° LABS	10
Valor asignado (X*)	2.77
SD robusta (S*)	0.24
SD diana (σ_p)	0.90
Incertidumbre (μ)	0.10



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

Tabla N°3. Resumen de resultados

Prueba	Evaluación satisfactoria	Resultados No Satisfactorios	Porcentaje de Resultados Satisfactorios
“Enumeración de <i>Escherichia coli</i> (NMP)	10	0	100.0 %

7. Comentarios

Participaron 10 laboratorios autorizados como Entidades de Ensayo de SANIPES, acreditados en la Norma NTP ISO/IEC 17025:2006 o NTP ISO/IEC 17025:2017, los cuales utilizaron los siguientes métodos:

- E. coli. ISO/TS 16649-3. 2015. Microbiology of food chain - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase positive *Escherichia coli* - Part 3: Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide.
- E. coli. ISO/TS 16649-3. 2017. Microbiology of food chain - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase positive *Escherichia coli* - Part 3: Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide (ISO/TS 16649-3. 2015, versión corregida 2016-12-15).

De los resultados reportados por los laboratorios participantes, obtuvieron un rendimiento satisfactorio 10/10 (100.0%), en el interlaboratorio para la “Enumeración de *Escherichia coli* (NMP). 2020- IV.

Esta prueba interlaboratorio para efectos de auditorías sanitarias no reemplaza los ensayos de aptitud que debe realizar el participante en cumplimiento de las directrices de su ente acreditador.

“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
“Año de la Universalización de la Salud”

8. Anexos

Anexo 1

Diseño del Ensayo de Aptitud “Enumeración de *Escherichia coli*”

CEA-SANIPES

