

ORGANISMO NACIONAL DE SANIDAD PESQUERA Y ACUÍCOLA
COORDINACIÓN DE ENSAYOS DE APTITUD-SANIPES
PROGRAMA INTERLABORATORIO
"ENUMERACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVA"
INFORME FINAL 2021-IV

Fecha de emisión: 2021/09/01

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:



Abog. Mercedes Govea Requena
Directora
Dirección Sanitaria y de Normatividad
Pesquera y Acuícola

Revisado por:



Bigo. Eduard Manuel Villalobos Infante
Coordinador de Ensayos de Aptitud
Dirección Sanitaria y de Normatividad
Pesquera y Acuícola



BICENTENARIO
PERÚ 2021

Página 1 de 12

CEA-FT-04, Rev. 01

Domingo Orué N° 165, piso 7, Surquillo - Lima
Av. Carretera a Ventanilla km 5.2 – Callao
www.sanipes.gob.pe

Fecha: 2020/12/30

DATOS DEL EQUIPO TÉCNICO:

<u>Nombre</u>	<u>Formación</u>	<u>Cargo</u>	<u>Firma</u>
Eduard Manuel Villalobos Infante	Biólogo	Coordinador de Ensayos de Aptitud	
Christian Miguel Rebatta Quintanilla	Biólogo	Responsable Técnico de Ensayos de Aptitud	



INDICE

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



BICENTENARIO
PERÚ 2021

Página 3 de 12

CEA-FT-04, Rev. 01

Domingo Orué N° 165, piso 7, Surquillo - Lima
Av. Carretera a Ventanilla km 5.2 – Callao
www.sanipes.gob.pe

Fecha: 2020/12/30

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 las Entidades de Ensayo autorizadas y previamente acreditadas por el INACAL, las cuales participan en el Control y Certificación Oficial 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.

Los Ensayos 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 las Entidades de Ensayo, fortaleciendo el rol del SANIPES y brindando confianza a los consumidores del mercado nacional y/o extranjero, así como a las autoridades sanitarias extranjeras.

El SANIPES, continuando con su programa de Interlaboratorios, organizó la prueba de Enumeración de *Staphylococcus coagulasa* positiva, ensayo usado en la Certificación Oficial Sanitaria del sector pesquero y acuícola y en algunos requisitos sanitarios de productos hidrobiológicos.

El recuento de *Staphylococcus coagulasa*- positivos, incluyen cepas enterotoxigénicas, principalmente *Staphylococcus aureus* pero también de otras especies tales como *Staphylococcus intermedius* y de ciertas cepas de *Staphylococcus hyicus*.

La cepa de *Staphylococcus aureus* es una especie bacteriana causante de gran número de intoxicaciones alimentarias de evolución aguda en el hombre, dada su capacidad para elaborar enterotoxinas extremadamente activas, que son la causa de intoxicaciones alimentarias. Las enterotoxinas elaboradas por este microorganismo pueden estar en muchos alimentos en los que esta bacteria ha logrado crecer y multiplicarse, sobre todo en los muy manipulados o en aquellos que se han preparado con antelación y se mantienen durante largo tiempo a una temperatura ambiente propicia. Entre estos alimentos se encuentra el pescado, el cual puede ser contaminado con este microorganismo a través de manipuladores infectados o a partir del medio ambiente. Con mayor frecuencia la contaminación procede de un individuo con una infección en las manos, con un resfriado o con dolor de garganta. La presencia de esta bacteria o sus enterotoxinas en alimentos procesados o en equipos de procesamiento de alimentos es generalmente un indicio de mala higiene.



Para el desarrollo del interlaboratorio de Enumeración de *Staphylococcus* coagulasa positiva se empleó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. 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 Ítems de Ensayo pueden contener diversos analitos no habituales con el fin de dar la oportunidad a los participantes de obtener una mayor experiencia.

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 del ensayo interlaboratorio aseguraron que cada participante reciba Ítems de Ensayo comparables y estables 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 "Enumeración de *Staphylococcus* coagulasa positiva", desarrollado por la Coordinación de Ensayos de Aptitud (CEA) de SANIPES en referencia de la ISO/IEC 17043:2010.

2. Declaración de Confidencialidad e Imparcialidad

Los participantes del ensayo Interlaboratorio "Enumeración de *Staphylococcus* coagulasa positiva", recibieron un código para su identificación, el cual es conocido únicamente por 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 el 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.



3. Procedimiento

La información sobre el diseño del Ensayo de Aptitud "Enumeración de *Staphylococcus coagulasa positiva*", se encuentra detallada en el Anexo 01.

4. Ítems de Ensayo

4.1. Preparación de los Ítems de Ensayo

El Ítem de Ensayo de este interlaboratorio fue preparado 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 25 gramos de Pota precocida congelada (*Dosidicus gigas*) contenida en un envase cónico (tubo), debidamente cerrada y sellado dentro de una bolsa de plástico 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.

Material Liofilizado

Para la preparación del Ítem de Ensayo se utilizó como microorganismo de interés:

- Lote liofilizado 132196 de fecha 2021-06-09, cultivo liofilizado de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

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

4.2. Homogeneidad

Del 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 *Staphylococcus coagulasa positiva*", ISO 6888-1:1999 / Amd 1:2003 / Amd 2:2018 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar médium.

Los datos fueron evaluados con el Test de Cochran para la evaluación de la variación de los recuentos y sus réplicas obtenidas al azar, luego se realizó un análisis de varianza (ANOVA)



p-valor=0.67, posteriormente se realizó el test de comparación de medias según la ISO 13528 (Desviación estándar de la "diana" (σ_{pt}) = 0.47).

Criterio de homogeneidad: $S_s \leq 0.3 \sigma_{pt}$
Resultado de la Homogeneidad $S_s=0.083$

4.3. Estabilidad

Los estudios de estabilidad de los Ítems de Ensayo enviados fueron desarrollados con la metodología ISO 6888-1:1999 / Amd 1:2003 / Amd 2:2018 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar médium, durante el periodo de ensayo 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 de los lotes preparados (ISO 13528: 2015) y se evaluó su estabilidad durante 3 períodos de tiempo diferentes (dentro del plazo de ensayo establecido).

Los datos fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) p-valor=0.057, 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}) = 0.47).

Criterio de estabilidad: **IMedia de Homogeneidad-Media de estabilidad (día) $I \leq 0.3 \sigma_{pt}$**

Resultado de la estabilidad:

- Primera evaluación: $0.057 < 0.14$
- Segunda evaluación: $0.094 < 0.14$
- Tercera evaluación $0.069 < 0.14$

4.4. Distribución y Transporte

Para la "Enumeración de *Staphylococcus* coagulasa positiva", cada laboratorio participante recibió una (1) bolsa de plástico sellada conteniendo un tubo cónico con 25 gramos de muestra (Pota precocida congelada) y un (1) vial con Liofilizado para la fortificación de la matriz, sellado e identificado con etiqueta impermeable.

Los laboratorios participantes fueron codificados según los Códigos: S-001, S-002, S-003, S-004, S-005, S-006, S-007 y S-008.



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 25 de junio del 2021, las instrucciones del interlaboratorio y los acuerdos con los participantes fueron entregadas junto con los Ítems de Ensayo.

NOTA 1: CEA-SANIPES no se responsabiliza por la estabilidad y homogeneidad de los Ítems de Ensayo, si éstos 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 de laboratorio de Referencia- CEA SANIPES (Log10) UFC/g	Microorganismos de Interés
Enumeración de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positiva CEA-SANIPES 2021-IV	6.79	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923

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:

a. 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 o en diferentes unidades de reporte.

- En este interlaboratorio **no se reportaron resultados no numéricos o en diferentes unidades de reporte.**

b. Conversión logarítmica

Para recuentos cuantitativos microbiológicos, es necesario una conversión logarítmica (log10) de los resultados, permitiendo con ello, obtener una distribución normal de resultados.

(Para los resultados "0" se considera "1" para poder 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.

C. 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.
- En este interlaboratorio no se reportaron resultados incongruentes.

d. 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), y la cual debe estar relacionada al valor asignado por el laboratorio de referencia (CEA-SANIPES), al ítem de ensayo respecto a las pruebas de homogeneidad y estabilidad del ítem de ensayo .
- En este Interlaboratorios el **valor asignado (X)= 6.74**

e. 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: **$\sigma_{pt} = 0.47$** .

f. 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:



“Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres”
 “Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia”

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

Donde:

- μ_x : Incertidumbre del valor asignado
- S^* : Desviación estándar robusta
- n : Número de laboratorios.

g. 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:

Tabla N°02. Interpretación de los valores Z-score

z-score	Clasificación
$Z \leq 2,00$	Satisfactorio (S)
$2,00 < Z < 3,00$	Cuestionable (C)
$Z \geq 3,00$	Insatisfactorio (I)



BICENTENARIO
 PERÚ 2021

Página 10 de 12

CEA-FT-04, Rev. 01

Domingo Orué N° 165, piso 7, Surquillo - Lima
 Av. Carretera a Ventanilla km 5.2 – Callao
www.sanipes.gob.pe

Fecha: 2020/12/30

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 julio de 2021, estos se presentan en la Tabla N°03.

Tabla N°03. Resultados individuales de los participantes en la prueba de "Enumeración de Staphylococcus coagulasa positiva", en matriz Pota precocida congelada para todos los participantes.

EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO DE LOS PARTICIPANTES									
Código Participante	(UFC/g)		Log X ₁	Log X ₂	X	S	INTERVALO		Z-SCORE
	X ₁	X ₂							
S-001	3100000	3400000	6.491	6.531	6.511	0.028	6.483	6.540	-0.5
S-002	8900000	8000000	6.949	6.903	6.926	0.033	6.894	6.959	0.4
S-003	5300000	5200000	6.724	6.716	6.720	0.006	6.714	6.726	-0.1
S-004	5200000	5200000	6.716	6.716	6.716	0.000	6.716	6.716	-0.1
S-005	5800000	5600000	6.763	6.748	6.756	0.011	6.745	6.767	0.0
S-006	5700000	5500000	6.756	6.740	6.748	0.011	6.737	6.759	0.0
S-007	5600000	5400000	6.748	6.732	6.740	0.011	6.729	6.751	0.0
S-008	6200000	5700000	6.792	6.756	6.774	0.026	6.748	6.800	0.1

Evaluación cuantitativa Satisfactoria: $|Z| \leq 2,00$

Evaluación cuantitativa Cuestionable: $2,00 < |Z| < 3,00$

Evaluación cuantitativa Insatisfactoria: $|Z| \geq 3,00$



Datos Estadísticos

N° LABS	8
Valor asignado (X*)	6.74
SD robusta (S*)	0.04
SD diana (σ_{pt})	0.43
Incertidumbre (μ)	0.02



BICENTENARIO PERÚ 2021

Página 11 de 12

CEA-FT-04, Rev. 01

Domingo Orué N° 165, piso 7, Surquillo - Lima
Av. Carretera a Ventanilla km 5.2 – Callao
www.sanipes.gob.pe

Fecha: 2020/12/30

7. Comentarios

Participaron 8 laboratorios acreditados en la Norma NTP ISO/IEC 17025 y autorizados por SANIPES. 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.

De los resultados reportados por los laboratorios participantes, obtuvieron un rendimiento satisfactorio 08/08 (100.0%), en el interlaboratorio de "Enumeración de *Staphylococcus coagulasa positiva*", en matriz Pota precocida congelada. 2021- IV.

8. Anexos

Anexo 1

Diseño del Ensayo de Aptitud "Enumeración de *Staphylococcus coagulasa positiva*"

CEA-SANIPES

