

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES POR  
LA TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLES UTILIZANDO UN MEDIO  
FLUOROGÉNICO

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:  
JOSÉ REMBERTO CABRERA AGUILAR  
MAGDALENA GUADALUPE HERNÁNDEZ ACOSTA

PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

MAYO DE 2008

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ

**SECRETARIO GENERAL**

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ

**FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**

**DECANO**

LIC. SALVADOR CASTILLO ARÉVALO

**SECRETARIA**

LICDA. MORENA LIZETTE MARTÍNEZ DE DÍAZ

## **COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACIÓN**

### **COORDINADORA GENERAL**

Licda. Maria Concepción Odette Rauda Acevedo

### **ASESORA DE ÁREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

MSc. Sonia Maricela Lemus Martínez

### **ASESORA DE ÁREA DE MICROBIOLOGÍA**

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

### **DOCENTES DIRECTORES**

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

Lic. René Francisco Ramos Alvarenga

## AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso y a la Santísima Virgen María por ayudarnos a enfrentar las dificultades con sabiduría y discernimiento, por brindarnos fortaleza y guiarnos con paso firme y constante a lo largo de nuestra carrera.

A nuestros padres y familiares pues con su valioso apoyo, comprensión y amor hemos alcanzado este logro, fruto de su esfuerzo y sacrificio.

A nuestros docentes directores, MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos y Lic. René Francisco Ramos, por su invaluable y valiosa colaboración y guía para desarrollar el presente trabajo y lograr culminarlo exitosamente, incentivándonos a prepararnos y desarrollarnos constantemente.

A Licda. Amy Elieth Moran, por el tiempo incondicional brindado, por habernos proporcionado las herramientas necesarias para la realización de nuestra investigación; siempre le estaremos agradecidos por su apoyo.

A las personas que nos brindaron su apoyo incondicional y les estamos sumamente agradecidos entre ellos al Ing. Jaime Planas, Lic. Eliseo Ayala, Sr. Juan José Rivas Cruz técnico de laboratorio microbiológico de CENSALUD, Ladislao Ardon por su valiosa colaboración y así también a nuestros amigos por haber sido parte fundamental en nuestra vida universitaria y en el desarrollo de este trabajo.

## DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso: que con su amor paternal fortaleció mi espíritu guiándome para alcanzar cada una de mis aspiraciones.

A mí querida madre Magdalena de Hernández, por tenerme presente siempre en sus oraciones, por todo su apoyo, esfuerzo y lucha a lo largo de los años.

A mi padre Carlos Hernández por fomentar en mí el deseo de superación.

A mis queridos hermanos: Edwin Alberto y Karla del Carmen, por todo el camino que hemos recorrido juntos, en el cual me han brindado todo su cariño, comprensión, consejos y ánimos.

A mi apreciada abuela Evelia Girón vda. de Acosta, pilar de mi familia; gracias por todo su amor y carisma. A mis tíos(as) Ana Ruth, Sonia, Manuel, Jorge, Joaquín, Carlos, Wilfredo, por su apoyo y por animarme a seguir adelante.

A mis verdaderos amigos por los gratos momentos que hemos compartido. A mi compañero de tesis, por su apoyo, comprensión y amistad.

A cada uno muchas gracias por todo el ánimo, fortaleza y paciencia que me han brindado durante toda la carrera y mi vida.

Magdalena Guadalupe Hernández Acosta

## DEDICATORIA

A Dios Padre todopoderoso por darme la vida y otorgarme la fortaleza y sabiduría para culminar con éxito mi carrera universitaria.

A mi madre Ana Gloria con todo mi amor le dedico este logro por el esfuerzo y cariño diario que ella realiza para apoyarme siempre en mi vida y mi carrera.

A mi padre José Manuel por el apoyo, ánimo y esfuerzo sin cesar de quien admiro y respeto su férrea voluntad de trabajo, para que pudiera alcanzar con éxito mi carrera. A mi hermano Gustavo por ser mi mejor amigo con quien puedo conversar y escuchar.

A mi tío Luís Antonio por su invaluable apoyo en mi formación académica, a mis tías: Elvira, M<sup>a</sup> del Carmen, M<sup>a</sup> Isabel, Ester, Inés y tío Cristóbal por su apoyo sincero y ánimo para que pudiera culminar mi carrera. A mis primos más cercanos que me han apoyado y a toda la familia.

A mí amiga y compañera de tesis por su dedicación para culminar este trabajo y sobre todo por su amistad así también todos mis amigos sinceros. A mí novia por el apoyo, afecto y comprensión que me brinda en la vida y en este proyecto.

José Remberto Cabrera Aguilar

## ÍNDICE

	Pág.
Resumen	
Capitulo I	
1.0 Introducción	xxiv
Capitulo II	
2.0 Objetivos	
Capitulo III	
3.0 Marco teórico	29
3.1 Fermentadores de la lactosa	29
3.1.1 Grupo coliforme total	29
3.1.2 Grupo coliforme fecal	30
3.1.2.1 <i>Escherichia coli</i>	31
3.2 Fermentación en tubos múltiples para miembros del grupo de los coliformes	33
3.2.1 Determinación de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> , por el método convencional de fermentación en tubos múltiples utilizando medios tradicionales.	34
3.2.1.1 Procedimiento de NMP para coliformes fecales.	36

3.2.2 Determinación de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> , por la técnica de tubos múltiples (NMP), utilizando el sustrato cromogénico y fluorogénico en agua potable	37
3.2.2 Cálculo y registro del NMP	38
3.3 Validación	39
3.3.1 Principios básicos de validación	40
3.3.2 Tipo de procesos de validación	41
3.4 Validación de métodos microbiológicos	42
3.4.1 Validación de método microbiológico cuantitativo	44
3.4.1.1 Limite de detección	45
3.4.1.2 Exactitud	45
3.4.1.3 Precisión	47
3.4.1.4 Inclusividad y exclusividad	49
3.5 Documentación	49
3.5.1. Protocolo de validación	50
3.5.2. Informe técnico	51
3.5.3. Evaluación de los resultados microbiológicos	52
3.5.4. Certificado de validación	52
Capitulo IV.	
4.0 Diseño metodológico	54
4.1 Tipo de estudio	54
4.2 Investigación bibliográfica	54

4.3	Parte experimental	54
4.4	Parámetros a evaluar de acuerdo a las guías de validación de métodos microbiológicos de la AOAC y la norma ISO 16140	55
4.4.1	Límite de detección	55
4.4.2	Precisión	55
4.4.3	Exactitud	57
4.4.4	Inclusividad	58
4.4.5	Exclusividad	59
4.4.6	Ensayo de la técnica de tubos múltiples (NMP)	59
4.4.6.1	Preparación del inóculo	59
4.4.6.2	Estandarización del inóculo	59
4.4.6.3	Preparación de las diluciones del inóculo	60
4.4.6.4	Técnica de los tubos múltiples (NMP), utilizando el sustrato cromogénico y fluorogénico (Fluorocult® caldo LMX)	61
4.4.6.5	Técnica de los tubos múltiples (NMP), utilizando el método convencional	62
4.4.6.6	Prueba para coliformes fecales (medio EC)	64
	Capítulo V.	
5.0	Resultados y discusión de resultados	66
5.1	Límite de detección	66

5.2	Precisión	67
5.2.1	Repetibilidad	67
5.2.2	Reproducibilidad	68
5.2.3	Falsos negativos	72
5.3	Exactitud	73
5.4	Inclusividad	75
5.5	Exclusividad	76
Capítulo VI		
6.0	Documentos de validación	78
Capítulo VII		
7.0	Conclusiones	128
Capítulo VIII		
8.0	Recomendaciones	132
Bibliografía		
Glosario		
Anexos		

## INDICE DE ANEXOS

### ANEXO N°

1. Tabla del índice de NMP y límites de aceptación del 95 por 100 para distintas combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se emplean diez porciones de 10 ml.
2. Escala MacFarlan.
3. Tabla para la preparación del medio líquido lauril triptosa.
4. Valores máximos admisibles para la calidad microbiológica del agua potable según la norma salvadoreña obligatoria NSO 13.07.01.97.
5. Figura esquemática de la prueba completa para la detección de coliformes totales.
6. Esquematización de la prueba de coliformes totales, fecales y ***Escherichia coli*** utilizando un medio fluorogénico (caldo LMX).
7. Tablas de resultados del ensayo para reproducibilidad del método fluorogénico realizado por 3 analistas.
8. Esquema de hoja de trabajo para realizar diluciones del inóculo.
9. Esquema de hoja de cálculos para determinar precisión, utilizando valor de media y desviaciones estándar calculadas usando el programa estadístico SPSS v. 14.0.

10. Esquema de hoja de resultados de la prueba t Student para evaluar exactitud calculado utilizando el programa estadístico SPSS v. 14.0 eng. for Windows.
11. Ejemplo de hoja de resultados de la prueba t Student para reproducibilidad proporcionado por el programa estadístico SPSS v. 14.
12. Tabla de puntos porcentuales de la distribución t.
13. Certificados de calibración de equipos realizados por el Laboratorio de Metrología Legal del CONACYT.
14. Certificados de calibración de material realizados por el Laboratorio de Metrología Legal del CONACYT.
15. Ensayos fluorogénicos para la determinación de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*.
16. Ensayos convencionales para determinación de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*.
17. Calibración de equipos y cristalería desarrollados por el Laboratorio Nacional de Metrología Legal.

## ÍNDICE DE CUADROS

### CUADRO N°

1. Perfil bioquímico de *Escherichia coli*.
2. Resultados promedio de falsos negativos para la técnica de tubos múltiples utilizando caldo LMX.
3. Resumen del procedimiento de la prueba t para dos muestras relacionadas.
4. Resultados de la inclusividad del método fluorogénico.
5. Resultados de la exclusividad del método fluorogénico.
6. Valores máximos admisibles para la calidad microbiológica del agua potable según la norma salvadoreña obligatoria NSO 13.07.01:97.
7. Hoja de trabajo para realizar diluciones del inóculo para llevarlo a un nivel de concentración determinado.
8. Ejemplo de hoja de cálculos para determinar precisión, utilizando valor de media y desviaciones estándar calculadas usando el programa estadístico SPSS v. 14.0.
9. Hoja de resultados de la prueba t Student para evaluar exactitud calculado utilizando el programa estadístico SPSS v. 14.0 eng. for Windows.
10. Ejemplo de hoja de resultados de la prueba t Student para reproducibilidad proporcionado por el programa estadístico SPSS v. 14.

## ÍNDICE DE FIGURAS

### FIGURA N°

1. Esquema de la prueba completa para la detección de coliformes totales.
2. Esquema de la prueba de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli* utilizando un medio fluorogénico (caldo LMX).
3. Viraje de color de caldo LMX a 24 h. de incubación con *E. coli*.
4. Fluorescencia de *E. coli* en caldo LMX.
5. Prueba de límite de detección.
6. Formación de gas en caldo LMX por acción de *E. coli*.
7. Formación de anillo indólico en caldo LMX.
8. Ensayos de precisión para método de NMP.
9. Falsos negativos para NMP.
10. Confirmación de *E. coli* por formación de anillo indólico.
11. Fluorescencia para ensayos de falsos negativos.
12. Ensayos de exactitud para método de NMP.
13. *Pseudomona aeruginosa* en caldo Fluorocult® para ensayo de exclusividad.
14. Ausencia de fluorescencia para ensayo de exclusividad.
15. *Enterobacter cloacae* en Fluorocult® para inclusividad del método.
16. Ausencia de fluorescencia para ensayo de inclusividad.
17. Prueba presuntiva (+) para coliformes en caldo LST.

18. Prueba confirmativa (+) para coliformes en caldo BRILLA.
19. Prueba para coliformes fecales en medio EC.
20. Resultados falsos negativos para el método convencional.
21. Calibración de baño maría.
22. Medición de temperatura a baño maría.
23. Calibración de incubadora de Laboratorio de Aguas de CENSALUD.
24. Medición de temperatura de incubadora.
25. Calibración de estufas.
26. Calibración de balanza granataria.
27. Patrones de peso para calibración de balanzas.
28. Indicador biológico para calibración de autoclave.

## ÍNDICE DE TABLAS

### TABLA N°

1. Resultados del ensayo para determinar el límite de detección del método fluorogénico.
2. Resultados del ensayo para repetibilidad del método fluorogénico.
3. Valores del NMP para el ensayo de la repetibilidad del método fluorogénico.
4. Valores de NMP/100 mL para repetibilidad del método fluorogénico transformados a logaritmo base 10.
5. Estimación de la desviación estándar y coeficiente de variación para la repetibilidad del método fluorogénico.
6. Valores del NMP para la reproducibilidad del método fluorogénico realizado por el analista 1.
7. Valores de NMP para reproducibilidad del método fluorogénico realizado por el analista 1, transformado a Log base 10.
8. Estimación de la desviación estándar y coeficiente de variación para la reproducibilidad del método fluorogénico realizado por analista 1.
9. Valores del NMP para la reproducibilidad del método fluorogénico realizado por el analista 2.
10. Valores de NMP para reproducibilidad del método fluorogénico de analista 2, transformados a Log base 10.

11. Estimación de la desviación estándar y coeficiente de variación para la reproducibilidad del método fluorogénico realizado por analista 2.
12. Valores del NMP para la reproducibilidad del método fluorogénico realizado por el analista 3.
13. Valores de NMP para reproducibilidad del método fluorogénico realizados por el analista 3, transformados a Log base 10.
14. Estimación de la desviación estándar y coeficiente de variación para la reproducibilidad del analista 3.
15. Coeficiente de variación promedio para cada una de los niveles de inóculo del microorganismo.
16. Resultados del ensayo para exactitud del método fluorogénico.
17. Valores del NMP para el ensayo de la exactitud del método fluorogénico.
18. Comparación de medias de método a validar y método de referencia para la exactitud del método del NMP.
19. Índice de NMP y límites de aceptación del 95 por 100 para distintas combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se emplean diez porciones de 10 ml.
20. Preparación de escala McFarland.
21. Preparación del medio líquido lauril triptosa.
22. Resultados del ensayo para reproducibilidad del método fluorogénico realizado por el analista 1.

23. Resultados del ensayo para reproducibilidad del método fluorogénico realizado por el analista 2.

24. Resultados del ensayo para reproducibilidad del método fluorogénico realizado por el analista 3.

25. Puntos porcentuales de la distribución t.

## ABREVIATURAS

**AOAC:** Asociación Oficial de Químicos Analistas (por sus siglas en inglés)

**APHA:** Asociación Americana de Salud Pública (por sus siglas en inglés)

**ATCC:** Colección Americana de Cepas Tipo (por sus siglas en inglés)

**°C:** grados Celsius o centígrados

**CONACYT:** Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

**CV:** Coeficiente de variación

**FDA:** Administración de Drogas y Alimentos (por sus siglas en inglés)

**GUD:**  $\beta$ -Glucuronidasa

**ICH:** Conferencia Internacional de Armonización (por sus siglas en inglés)

**ISO:** Organización Internacional de Estandarización (por sus siglas en inglés)

**LMX:** Lauril sulfato triptosa MUG - X - GAL

**LST:** Lauril sulfato triptosa

**mL:** mililitro

**MUG:** 4-metilumberiferil- $\beta$ -D-glucoronido

**NMP:** Número más probable

**NMP/100 mL:** Número más probable por cien mililitros.

**NTU:** Unidades nefelométricas de turbidez.

**NSO:** Norma Salvadoreña Obligatoria

**ONPG:** o - nitrofenil - D - galactopiranosido.

**PCS:** estudios precolaborativos

**ppm:** partes por millón

**p/v:** peso sobre volumen

**spp:** especie

**S<sub>R</sub>:** Desviación estándar de la reproducibilidad

**S<sub>r</sub>:** Desviación estándar de la repetibilidad

**r:** valor de repetibilidad

**R:** valor de reproducibilidad

**®:** Marca registrada

**RSD:** Desviación estándar relativa

**t exp:** t Student experimental

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**USP:** Farmacopea de los Estados Unidos de América (por sus siglas en inglés)

**X - GAL:** 5-bromo-4-cloro -3-indol- β-D-galactopiranosido

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, teniendo como principal objetivo la validación de uno de los métodos microbiológicos más empleados para el análisis de aguas, como el método del número más probable por la técnica de tubos múltiples utilizando como medio de cultivo un caldo fluorogénico, de acuerdo a las guías de validación de métodos microbiológicos cualitativos y cuantitativos de la AOAC Internacional y la norma ISO 16140; analizando muestras de agua estéril artificialmente contaminada. Al mismo tiempo se deja constancia de los procedimientos como referencia para el correcto uso del método microbiológico, que proporcione evidencia de que el método funciona con todas las características para el cual ha sido diseñado.

Para el desarrollo del objetivo de estudio se empleó metodología analítica como la estandarización del inóculo bacteriano, a partir del cual fueron preparadas soluciones diluidas para los diferentes niveles de inóculo, los cuales fueron sometidos a la evaluación de parámetros de validación para determinar la exactitud, precisión, inclusividad, exclusividad y límite de detección del método alternativo.

De acuerdo a los resultados obtenidos se comprueba que el método del NMP utilizando un medio fluorogénico proporciona resultados satisfactorios con una precisión y exactitud que no difiere significativamente con la del método oficial.

El empleo del medio fluorogénico es una alternativa atractiva para la detección de coliformes en aguas que pueden emplear los laboratorios para realizar los ensayos con mayor rapidez, menos costos y proporciona mayor confianza por el hecho que falsos negativos pueden ser detectados en comparación con el método de referencia.

CAPITULO I  
INTRODUCCIÓN

## 1.0 INTRODUCCIÓN

La detección y enumeración de bacterias indicadoras son de primordial importancia para el monitoreo de la calidad microbiológica del agua. Los coliformes fecales y *Escherichia coli* son empleados como indicadores de contaminación fecal.

El uso del método del número más probable (NMP) descrito por la Organización Internacional de Estandarización (ISO) involucra una prueba presuntiva seguida por una prueba confirmativa para la enumeración de coliformes totales y fecales. Este ensayo está basado en las propiedades de producción de ácido o gas por la fermentación de la lactosa.

El uso del fluorógeno, 4-metilumbiferil- $\beta$ -D-glucoronido (MUG) para detectar la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUD) en coliformes, está basado en la observación que 96-97% de cepas de *E. coli* producen esta enzima, donde solamente otras Enterobacterias pueden producirla: *Salmonella spp*, *Shigella spp* y *Yersinia spp*.

La enzima  $\beta$ -glucuronidasa que es producida por la bacteria *Escherichia coli* es capaz de hidrolizar el MUG, ocasionando una fluorescencia en el caldo bajo la luz ultravioleta de onda larga (366 nm), la cual se considera como prueba positiva para *E. coli*.

Estos ensayos fluorogénicos tienden a ser más sensibles y rápidos que el método convencional.

Para demostrar que el método alternativo es adecuado para su uso, es necesario desarrollar un proceso de validación, ya que durante esta secuencia de ensayos es donde el analista se da cuenta si el estudio, el cual está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

Este trabajo incluye una validación concurrente para la evaluación del método microbiológico del número más probable realizada según las guías de la AOAC Internacional para la validación de métodos microbiológicos cualitativos y cuantitativos, los procedimientos de la Asociación Americana de Salud Pública y la norma ISO 16140 que recomienda la evaluación de los parámetros: exactitud, precisión, límite de detección, inclusividad y exclusividad.

El presente trabajo de validación se llevó a cabo mediante ensayos repetitivos, utilizando las diferentes variables que establece cada parámetro, para el aseguramiento de los resultados obtenidos; contando además con una adecuada documentación que proporcione evidencia sobre el proceso de validación.

## CAPITULO II

### OBJETIVOS

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general:**

Validar la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.

### **2.2. Objetivos específicos**

2.2.1. Realizar el método microbiológico del número más probable usando un medio fluorogénico acorde a las especificaciones de la AOAC INTERNACIONAL y la APHA, en muestra de agua estéril artificialmente contaminada.

2.2.2. Evaluar los criterios de validación: exactitud, precisión, límite de detección, inclusividad y exclusividad según especificaciones de la AOAC INTERNATIONAL y la norma ISO 16140.

2.2.3. Comparar los resultados obtenidos con la utilización de medios convencionales para el NMP y la utilización del medio cromogénico - fluorogénico.

2.2.4. Desarrollar la documentación del proceso de validación como son: protocolo, informe y certificado de validación del método microbiológico alternativo.

CAPITULO III  
MARCO TEÓRICO

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1. FERMENTADORES DE LA LACTOSA <sup>(2)</sup>

##### 3.1.1. Grupo Coliforme total:

El grupo coliforme está formado por todas las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, gramnegativas, no formadoras de esporas y con forma de bastón que fermentan la lactosa, produciendo gas y ácido en 48 horas a 35° C. Pertenecen a este grupo los géneros: ***Escherichia, Citrobacter, Enterobacter y Klebsiella.***

Las bacterias de este género se encuentran principalmente en el intestino de los humanos y de los animales de sangre caliente, es decir, homeotermos, pero también ampliamente distribuidas en la naturaleza, especialmente en suelos, semillas y vegetales. En general, las bacterias coliformes totales se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo. Los coliformes se introducen en gran número al medio ambiente por las heces de humanos y animales. Por tal motivo suele deducirse que la mayoría de los coliformes que se encuentran en el ambiente son de origen fecal. Sin embargo, existen muchos coliformes de vida libre.

Tradicionalmente se los ha considerado como indicadores de contaminación fecal en el control de calidad del agua destinada al consumo humano en razón de que, en los medios acuáticos, los coliformes totales son más resistentes que las bacterias patógenas intestinales y porque su origen es principalmente fecal.

Por tanto, su ausencia indica que el agua es bacteriológicamente segura. Asimismo, su número en el agua es proporcional al grado de contaminación fecal; mientras más coliformes se aíslan del agua, mayor es la gravedad de la descarga de heces.

No todos los coliformes son de origen fecal, por lo que se hizo necesario desarrollar pruebas para diferenciarlos a efectos de emplearlos como indicadores de contaminación. Se distinguen, por lo tanto, los coliformes totales que comprende la totalidad del grupo y los *coliformes fecales*, aquellos de origen intestinal. Desde el punto de vista de la salud pública, esta diferenciación es importante, puesto que permite asegurar con alto grado de certeza que la contaminación que presenta el agua es de origen fecal.

### **3.1.2. Grupo coliforme fecal:**

Son bacterias que forman parte del grupo coliforme total y son definidas como bacilos gramnegativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a  $44.5 \pm 0.2$  °C, dentro de las  $48 \pm 2$  horas. Este grupo también es denominado termotolerante y la especie más predominante es la ***Escherichia coli***, que constituye una gran proporción de la población intestinal humana. <sup>(13)</sup>

### 3.1.2.1. *Escherichia coli*:

Es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa y descarboxila la lisina generalmente. <sup>(17)</sup>

Cuadro I. Perfil bioquímico de *Escherichia coli*. <sup>(9)</sup>

BACTERIA	PRUEBA BIOQUÍMICA	RESULTADO
<i>Escherichia coli</i>	Bisel	A
	Fondo	A
	Gas	+
	Ácido Sulfhídrico	-
	Indol	+
	Rojo de Metilo	+
	Voges – Proskauer	-
	Citrato	-
	Movilidad	+

- = Negativo  
+ = Positivo

K = Alcalino (rojo)  
A = Ácido (amarillo)

IMVIC  
++ --

El aislamiento de esta bacteria en el agua da alto grado de certeza de contaminación de origen fecal, alrededor del 99%. No es absoluta, porque se han aislado cepas de *E. coli* que no tienen origen fecal, pero es un grado de certeza más que razonable para certificar contaminación con ese origen. Sin embargo, el aislamiento de este microorganismo no permite distinguir si la contaminación proviene de excretas humanas o animales, debido a que la *Escherichia coli* de origen animal y la de origen humano son idénticas, lo cual puede ser importante. Puesto que la contaminación que se desea habitualmente controlar es la de origen humano. <sup>(6)</sup>

Se distinguen cinco cepas de ***E. coli*** según su poder patógeno:

1. ***E. coli*** enteropatógena (ECEP)
2. ***E. coli*** enterotoxigénica (ECET)
3. ***E. coli*** enteroinvasiva (ECEI)
4. ***E. coli*** entero hemorrágica o verotoxigénica (ECEH)
5. ***E. coli*** entéroagregativa (ECEA)

Cada grupo produce enfermedad por un mecanismo diferente, y los síndromes resultantes suelen diferir desde los puntos de vista clínico y epidemiológico. Por ejemplo, las cepas ECET y ECEI sólo infectan al ser humano. Los alimentos y el agua contaminada por desechos humanos son los medios principales de transmisión del proceso infeccioso. <sup>(13)</sup>

La ***Escherichia coli* 0157:H7** es una de cientos de cepas de la ***E. coli***, aunque la mayoría de las cepas son inocuas y viven en los intestinos de los seres humanos y animales saludables, esta cepa produce una potente toxina y puede ocasionar una enfermedad grave. Se diferencia de las otras ***E. coli*** en que no fermenta el sorbitol, no crece a 44 °C y no produce  $\beta$ -glucuronidasa. <sup>(14)</sup>

### **3.2. FERMENTACIÓN EN TUBOS MÚLTIPLES PARA MIEMBROS DEL GRUPO DE LOS COLIFORMES. (2)**

La prueba estándar para el grupo coliforme puede realizarse mediante una técnica de fermentación en tubos múltiples o por la técnica de filtración por membrana. Son aplicables ambos métodos teniendo en cuenta las limitaciones que se especifican y el propósito del estudio. En el caso de la técnica de fermentación en tubos múltiples, los resultados del estudio de los tubos y diluciones replicados se reportan en término de número más probable (NMP) de microorganismos existentes por 100 mL de agua. Este número, basado en determinadas fórmulas de probabilidad, es un cálculo de la densidad media de coliformes en la muestra.

La precisión de cada prueba depende del número de tubos utilizados. Se obtiene una información más satisfactoria cuando el mayor inóculo de muestra estudiado muestra gas en alguno o en todos los tubos, y el más pequeño muestra gas en ninguno o en la mayoría de los tubos.

La densidad bacteriana puede calcularse mediante la fórmula facilitada por medio de la tabla que utiliza el número de tubos positivos en las diluciones múltiples. Las tablas de NMP se basan en la hipótesis de una distribución de Poisson (dispersión aleatoria). Sin embargo, si la muestra no se ha agitado adecuadamente antes de hacer las porciones o si existe agrupamiento de bacterias, el valor del NMP podrá resultar menor que el número real de densidad bacteriana.

Sin embargo, el interés por la técnica de tubos múltiples, las numerosas investigaciones realizadas sobre la precisión del NMP y la expresión de los resultados de la prueba en forma de NMP no deben llevar a considerar este método como un ejercicio estadístico en lugar de como un medio de valorar la densidad de coliformes en un agua y su calidad sanitaria.

### **3.2.1. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES, POR EL MÉTODO CONVENCIONAL DE FERMENTACION EN TUBOS MULTIPLES UTILIZANDO MEDIOS TRADICIONALES <sup>(2)</sup>**

#### **NMP para coliformes totales.**

##### **A) Fase presuntiva:**

Se utiliza un medio líquido de lauril triptosa (LST) en la prueba de tubos múltiples. En la fase presuntiva, el número de tubos y volumen de muestra seleccionada depende de la cantidad y de las características del agua que se estudiará. Para agua potable, utilizar 5 tubos conteniendo cada uno 10 mL de muestra o 10 tubos con 10 mL de muestra; si se trata de agua no potable se utilizarán 5 tubos por dilución (de 10, 1 y 0.1 mL). Antes de esterilizar el medio, colocar en tubos de fermentación con un vial invertido, una cantidad suficiente de medio como para que cubra el vial (ver anexo 3). <sup>(2)</sup>

**B) Fase confirmativa:**

En esta fase se utilizan tubos de fermentación con vial invertido conteniendo el medio líquido verde brillante lactosa bilis (BRILLA); el pH del medio debe de ser de  $7.2 \pm 0.2$  después de la esterilización. Colocar en los tubos de fermentación suficiente cantidad de medio para cubrir al menos parcialmente un vial invertido. (2)

**C) Prueba completa:**

Para establecer definitivamente la existencia de bacterias coliformes y obtener datos más seguros sobre el control de calidad del agua, la prueba completa se practica en todos los tubos positivos que muestran gas en la fase confirmatoria. Placas de agar EMB son estriadas de los tubos positivos de medio líquido de verde brillante lactosa bilis, para detectar colonias de coliformes que pueden ser típicas (rosadas a rojo oscuras con brillo verde metálico superficial) o atípicas (rosas, rojas, blancas o incoloras sin brillo) a las 24 horas de incubación. Colonias típicas o colonias que se consideren como probablemente formadoras por microorganismos del grupo coliforme se utilizan para sembrar en tubo de fermentación con medio de lauril triptosa.

El resultado positivo de la prueba completa requiere la formación de gas en los tubos secundarios con medio de lauril triptosa en  $48 \pm 3$  horas lo que demuestra la presencia de un miembro del grupo coliforme total. (2)

En muestras artificialmente contaminadas con microorganismo coliforme específico (ej. *Escherichia coli*) no es necesario realizar la prueba completa; sin embargo, si se quiere comprobar se puede realizar un estriado en placa con medio EMB para detectar las colonias de coliformes totales por su brillo verde metálico superficial.

#### **3.2.1.1. Procedimiento de NMP para coliformes fecales. (2)**

Existen procedimientos de alta temperatura para separar microorganismos del grupo coliforme procedentes de fuentes fecales o no fecales. La prueba puede realizarse por la técnica de tubos múltiples empleando el medio EC cuando se utiliza en la prueba de confirmación. No debe utilizarse para el aislamiento directo de coliformes en el agua, ya que es necesario un enriquecimiento previo en un medio que se presume infectado para conseguir un aislamiento óptimo de coliformes fecales.

No se debe considerar sustituto de la prueba completa para coliformes en el estudio de las aguas potables, ya que en las mismas no se puede tolerar la presencia de ningún tipo de bacterias que no sean coliformes fecales. El fundamento de esta prueba es la temperatura (44.5 °C), a la cual deben incubarse las coliformes fecales procedentes del intestino de los animales de sangre caliente. Para esta prueba, los tubos con caldo EC deben llevar un vial invertido con cantidad suficiente de medio que cubra, al menos parcialmente, al vial después de la esterilización. El pH del medio debe ser de  $6.9 \pm 0.2$ .

### 3.2.2. DETERMINACIÓN SIMULTANEA DE COLIFORMES TOTALES Y ESCHERICHIA COLI, POR LA TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP), UTILIZANDO EL SUSTRATO CROMOGÉNICO Y FLUOROGÉNICO.

El método consta de una sola etapa que consiste en colocar volúmenes determinados de muestras de agua en una serie de tubos conteniendo medio de cultivo Fluorocult<sup>®</sup> caldo LMX (Lauril sulfato-MUG-X-GAL) y luego son incubados a  $35 \pm 0.5$  °C durante 24 horas. El caldo Fluorocult<sup>®</sup> contiene un cromógeno, 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-GAL), el cual es hidrolizado por la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa que es producida por las bacterias coliformes totales, ocasionando un cambio de color en el caldo, de amarillo claro a azul – verde que indica y confirma una prueba positiva para coliformes totales dentro de 24 - 48 horas. <sup>(10)</sup>

Así mismo, el caldo contiene un fluorogéno, 4-metilumberiferil- $\beta$ -D-glucoronido (MUG), el cual es hidrolizado por la enzima  $\beta$ -D-glucoronidasa que es producida por la bacteria ***Escherichia coli***, ocasionando una fluorescencia en el caldo bajo la luz ultravioleta de onda larga (336 nm) que indica la presencia de esta bacteria. <sup>(10)</sup>

Para confirmar la presencia de ***E. coli*** debe comprobarse la producción de Indol en los tubos que presentan fluorescencia, utilizando el reactivo de Kovacs indol (solución de p-dimetilaminobenzaldehido en alcohol amílico); por medio del desarrollo de un anillo color rosado que indica una reacción positiva.

### 3.2.3. CÁLCULO Y REGISTRO DEL NMP (APHA) <sup>(2)</sup>

Calcular y registrar el número de hallazgos positivos de microorganismos del grupo coliforme en términos del número más probable (NMP). Las tablas indican los valores del NMP para distintas series de siembras y resultados. En ellas se contemplan límites de confianza del 95 % para cada valor del NMP, reportar el valor del número de tubos positivos y negativos en forma de NMP/100mL (ver anexo 1).

Una consideración general que plantea la AOAC INTERNACIONAL para la validación de métodos microbiológicos, es referente a los resultados obtenidos teniendo en cuenta que en microbiología estos no muestran una distribución estadística normal; para conseguir una distribución más simétrica, los datos obtenidos deben ser transformados a logaritmo base 10. Esto es de suma importancia al momento de validar un método microbiológico ya que los datos transformados son aplicables para la evaluación de los parámetros de validación. <sup>(10)</sup>

Respondiendo a la necesidad de validar este tipo de método microbiológico se plantean a continuación términos y definiciones referentes a procedimientos de validación de métodos alternativos.

### 3.3. VALIDACIÓN

En la práctica, validar un método es realizar un conjunto de pruebas de manera de comprobar varios aspectos del comportamiento del mismo, establecer que sirve para el fin previsto. (7)

Al término validación se le ha dado diferentes definiciones de acuerdo al ámbito de aplicación en la cual se implementa, entre las cuales se mencionan:

**Validación [USP 29]:** es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. (20)

**Validación primaria [ISO 9000: 2000]:** confirmación, mediante el aporte de pruebas objetivas, de que se han cumplidos los requisitos para el uso pretendido o una aplicación específica. (7)

**Validación secundaria [ISO 9000:2000]:** demostración, por experimento, que un método establecido funciona de acuerdo con las especificaciones en las manos del usuario. (7)

**Verificación:** confirmación, mediante el aporte de pruebas objetivas, de que se han cumplido los requisitos establecidos.

**Validación de un Método Alternativo [AOAC]:** es la validación de un método de análisis que demuestra o estima un analito (un microorganismo, sus componentes o su producto), como lo hace su correspondiente método de referencia. (10)

El método alternativo exhibe atributos apropiados a las necesidades de los usuarios, por ejemplo: la velocidad de análisis y/o respuesta; la facilidad de ejecución y/o automatización; las propiedades analíticas (la precisión, exactitud, el límite de detección, etc.); la reducción de costo. <sup>(12)</sup>

### **3.3.1. PRINCIPIOS BÁSICOS DE VALIDACIÓN <sup>(4)</sup>**

Para validar un método se hace necesario comprobar que los elementos y operaciones involucradas en el método estén aptos para poder dar los resultados esperados. Para ello se deben tomar en cuenta las siguientes variables:

- Materiales: se debe contar con proveedores certificados.
- Equipos e instalaciones: incluye instrumentos y aparatos que se utilizan en el proceso. Evaluando las variaciones que puedan ocurrir durante el mismo. En cuanto a las instalaciones se deben evaluar aspectos como temperatura, humedad, aire, etc.
- Métodos: es necesario contar con procedimientos escritos para todas las operaciones.
- Personal: incluye un programa de adiestramiento inicial documentado.

La validación de los métodos de ensayo debe:

- Reflejar las condiciones reales de ensayo.
- La extensión de la validación necesaria dependerá del método y su aplicación.

- La debe realizar personal calificado para esa actividad.
- En todos los casos un parámetro para la validación de ensayos microbiológicos es la descripción del método de ensayo. (12)

### 3.3.2. TIPO DE PROCESOS DE VALIDACIÓN (4)

En el enfoque experimental los tipos de validación a realizar son:

**Validación prospectiva:** es aquel estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que esta previsto, basado en un protocolo planificado.

**Validación concurrente:** aplicada a pequeños cambios, revalidaciones o en procesos que no han sido validados pero son utilizados normalmente como técnica de análisis. También se aplica en los casos de nuevos fabricantes de principios activos.

Basándose en un análisis de datos históricos, se pueden aplicar los siguientes tipos de validación:

**Validación retrospectiva:** es aquel estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que estaba previsto sobre la base de una revisión y análisis de una revisión histórica.

**Revalidación:** la revalidación está fraccionada en dos categorías, la primera es la revalidación después de algún cambio y la revalidación periódica.

En la categoría anterior, los cambios característicos que requieren revalidación incluyen por ejemplo los cambios en una materia prima, los cambios en los parámetros del proceso, los cambios en el equipo, incluidas reparaciones mayores y los cambios en los locales.

La revalidación periódica ofrece la oportunidad de verificar que los sistemas están todavía operando como cuando fueron originalmente validados y que ningún cambio no intencional se ha efectuado en el proceso, el sistema o la unidad de equipo y el resultado final.

### **3.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS <sup>(1,7)</sup>**

El diseño de un estudio de validación según las guías para la validación de métodos microbiológicos cualitativos y cuantitativos de la AOAC INTERNATIONAL (revisada 5/2002) <sup>(1)</sup> hace referencia que para un método cuantitativo se realizan estudios precolaborativos o validación interna (estudios comparativos) donde se realiza una comparación del método a validar con el método de referencia. Aplica de igual forma para métodos cualitativos, teniendo en cuenta que la ISO 16140 recomienda que para ambos métodos se realicen estudios de inclusividad y exclusividad sólo para ensayos selectivos.<sup>(7)</sup>

Estas guías que son aplicables para la validación de métodos alternativos, sean comerciales o no, recoge los estatutos de la AOAC con la intención de armonizar los procedimientos de validación con la norma ISO 16140 (Protocolo

de validación de métodos alternativos), y los datos que produzca el método alternativo satisfagan los requerimientos y criterios de aceptación contenidos en la ISO 16140 y puedan ser recíprocos al aplicarse los requerimientos específicos de estas guías en una validación; sin embargo, algunos datos adicionales pueden ser requeridos. <sup>(10)</sup>

El protocolo de validación de métodos alternativos <sup>(1)</sup> se divide en dos partes:

El método cualitativo, el cual provee de guías para la detección de presencia - ausencia de microorganismos en matrices de alimentos; y el método cuantitativo, el cual provee guías para el estudio de métodos para la enumeración de células microbianas, incluidos el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y el conteo del número más probable (NMP).

Al realizar los estudios prelaborativos en ensayos selectivos se evalúan aspectos como el recuento de microorganismos específicos, en el cual se hace una inoculación del microorganismo específico y el nivel del inóculo se evalúa en 3 niveles de concentración del microorganismo (bajo, medio y alto) que abarquen todo el intervalo a validar y un control sin inocular. Si se realiza un ensayo no selectivo usar muestras naturalmente contaminadas y no realizar el control <sup>(10)</sup>. Para cada tipo de alimento se analizan por duplicado (dos porciones) el método a validar y el método de referencia. <sup>(7)</sup>

El uso de muestras naturalmente contaminadas y preparación de muestras artificialmente contaminadas en estudios de validación de métodos microbiológicos están contemplados en la ISO 16140:1999 <sup>(10)</sup> la cual las establece en cuatro opciones:

- Primera opción: muestras naturalmente contaminadas
- Segunda opción: contaminación por mezcla.
- Tercera opción: muestras inoculadas (el nivel de microflora debe representar la contaminación de las muestras naturalmente contaminadas).
- Cuarta opción: materiales de referencia

Validar un método microbiológico requiere una comparación con un método de referencia, usando cepas de referencia y cepas de referencia certificadas (material de referencia); además de la evaluación sistemática de factores como ensayos internos o precolaborativos. <sup>(18)</sup>

#### **3.4.1. VALIDACIÓN DE MÉTODO MICROBIOLÓGICO CUANTITATIVO <sup>(10)</sup>**

Las características analíticas típicas usadas en la validación de métodos microbiológicos definidos por la ISO 16140 <sup>(7)</sup> la cual considera como criterios de validación los siguientes parámetros:

- Límite de detección.
- Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)
- Exactitud

- Inclusividad (sensibilidad)
- Exclusividad (especificidad)

#### **3.4.1.1. LIMITE DE DETECCIÓN <sup>(1)</sup>**

Es la cantidad mínima de analito (microorganismo), que puede ser detectada e identificada, en las condiciones experimentales indicadas.

Para procedimientos no instrumentales, el límite de detección se determina generalmente mediante el análisis de muestras, con concentraciones conocidas de analitos, estableciendo el nivel mínimo del analito que puede detectarse confiablemente. <sup>(20)</sup>

#### **3.4.1.2. EXACTITUD**

Definición: indica la capacidad del método analítico de dar un resultado lo más próximo posible al valor verdadero <sup>(20)</sup>. Es decir que expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero, y la capacidad del método analítico para dar los resultados lo más próximos posibles a dicho valor.

Si la diferencia entre el valor encontrado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena.

En cambio una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y refleja la existencia de errores que deben corregirse.

Matemáticamente, se expresa como la diferencia entre el valor hallado y el verdadero. Estadísticamente suele expresarse por el resultado de realizar un

test de t de Student para determinar si el valor hallado y el valor considerado como verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado.

Si  $t$  experimental es menor a  $t$  de tablas para el riesgo escogido, significa que ambos valores no son estadísticamente diferentes, comprobándose que el método analítico tiene la exactitud requerida. En cambio si  $t$  experimental es mayor a  $t$  de tablas significa que el método analítico no es exacto y existe un error sistémico.

Los documentos ICH <sup>(22)</sup> recomiendan que se evalúe la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración (alto, medio y bajo), cubriendo el intervalo especificado (es decir tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración).

Las guías de la AOAC INTERNATIONAL para la validación de métodos microbiológicos cualitativos y cuantitativos <sup>(1)</sup> expresan que para determinar la exactitud se realiza por comparación estadística de los resultados de un método novedoso con relación a un método oficial o de referencia, o un método convencional donde un método oficial no existe sobre el rango de enumeración aplicable. Usualmente, muestras que conllevan el analito (microorganismo) son frecuentemente usadas, pero muestras inoculadas cuantitativamente y muestras fortificadas pueden también ser usadas. Muestras certificadas del inóculo de referencia pueden ser usadas cuando sean disponibles y aplicables.

#### **6.4.1.3. PRECISION** <sup>(20)</sup>

La USP 29 define la precisión de un procedimiento analítico como el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. Es decir mide que tan cerca se encuentran los resultados uno del otro.

La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones donde la media aritmética es el valor central y la desviación estándar es la dispersión de los resultados.

La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación.

En este contexto, la reproducibilidad es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes.

Su ensayo debe estudiar las principales condiciones de variabilidad del método analítico: tiempo (días diferentes), analistas e instrumentos.

La reproducibilidad global se determina por el coeficiente de variación. Si se desea estudiar el efecto de cada una de las tres variables por separado (tiempo, analistas e instrumentos) deberá realizarse un análisis de varianza. Muchas veces solo es suficiente realizar un ensayo de reproducibilidad teniendo en cuenta únicamente el tiempo. <sup>(18)</sup>

La Repetibilidad se refiere a la utilización de un procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo de tiempo corto realizado por el mismo analista, con el mismo equipo. <sup>(18)</sup>

Los documentos ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración, o un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba) <sup>(20)</sup>. Las guías de la AOAC Internacional recomiendan en forma más específica que para una validación de métodos microbiológicos se deben realizar ensayos por quintuplicado para cada nivel de inóculo. <sup>(1)</sup>

La precisión de un procedimiento analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea, que permita calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Los análisis en este contexto son análisis independientes de muestras que se han llevado a cabo mediante el procedimiento analítico completo, desde la preparación de las muestras hasta resultado final de las pruebas.

#### **3.4.1.4. INCLUSIVIDAD Y EXCLUSIVIDAD <sup>(1)</sup>**

Estos requerimientos no son aplicables para el conteo total de microorganismos viables, hongos y levaduras o similares métodos de enumeración que no son directamente para la determinación de microorganismos específicos. Las guías de la AOAC INTERNATIONAL para la validación de métodos microbiológicos cualitativos y cuantitativos definen inclusividad como la habilidad de un método alternativo para detectar el analito de interés de un amplio rango de cepas o también se puede definir como la capacidad del método para detectar diferentes microorganismos pertenecientes al grupo (sensibilidad).

La exclusividad es la ausencia en el método alternativo de interferencia por un amplio rango de cepas que no son de interés en el estudio o sea que se basa en la especificidad del método en la cual diferentes microorganismos que no pertenecen al grupo no deben ser detectados.

#### **3.5. DOCUMENTACIÓN <sup>(15)</sup>**

Luego de realizar la validación, se debe dejar una evidencia que sea un instrumento que proporcione la información necesaria para el correcto funcionamiento del método y que garantice que los resultados obtenidos son los esperados. Documentación de la validación:

- Protocolo de validación
- Informe de validación
- Certificado de validación

### 3.5.1. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN <sup>(7)</sup>

Un protocolo de validación es un documento detallado en relación con una parte específica del proceso de validación. Esboza las pruebas que se llevarán a cabo, incluye una definición del método a valorar, los criterios de aceptación y la información que debe registrarse. También define el proceso de aprobación para la validación.

El protocolo claramente debe describir el procedimiento a seguirse para realizar la validación. Debe incluir al menos los objetivos de la validación y el estudio de calificación, el sitio del estudio, el personal responsable, una descripción del equipo a usarse (incluyendo la calibración antes y después de la validación), los procedimientos estándar de operación a seguirse (por ejemplo, la operación y limpieza del equipo) y las normas y criterios para los productos y procesos pertinentes. También debe estipularse el tipo de validación y tiempo/frecuencia. Los procesos y/o los parámetros a validarse deben identificarse claramente.

Protocolo incluye los siguientes ítems:

- Objetivos de la validación: finalidad de la validación, fecha de inicio y final.
- Lugar del estudio
- Responsable(s): se definirá el nombre y responsable de realizar la validación
- Parámetros a estudiar: seleccionados de acuerdo a las características de la muestra, tipo de método analítico

- Muestra: se describe brevemente que tipo de muestra se han utilizado, sus características, tratamiento previo.
- Métodos analíticos: descripción del procedimiento para determinar los parámetros a evaluar. Indicando medios, reactivos, materiales estériles, técnica y cálculos.
- Límite de aceptación: se establece para cada uno de los parámetros.

### **3.5.2. INFORME TÉCNICO <sup>(7)</sup>**

Los resultados obtenidos durante el desempeño de la validación, deben registrarse.

El informe de validación refleja los resultados finales de los ensayos y otros documentos como los certificados de calibración de los instrumentos. Es sobre la base de este informe que se toma la decisión de si un proceso particular está validado. Durante la inspección, se debe de evaluar si hay un informe escrito que refleje los resultados después de la finalización de la validación. Los resultados deben haberse evaluado, analizado y comparado con los criterios de aceptación por el personal responsable. Todos los resultados deben satisfacer los criterios de aceptación y satisfacer el objetivo indicado. Si fuera necesario, deben haberse realizado los estudios adicionales. Si los resultados se encontraran aceptables, el informe debe ser aprobado y autorizado (firmado y fechado).

Un informe técnico de validación debe de incluir los siguientes aspectos:

- Título
- Objetivo del estudio
- Referencia al protocolo
- Detalles de material
- Equipo
- Programas y ciclos de uso
- Detalles de los procedimientos y métodos de análisis

### **3.5.3. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS**

Realiza una discusión de los resultados y conclusiones donde se indicara si se acepta o rechaza la validación.

### **3.5.4 CERTIFICADO DE VALIDACIÓN**

Este en un documento formal de aprobación, firmado por la personas responsables. Puede ser independiente e incluir un resumen del protocolo de validación y los resultados obtenidos.

CAPITULO IV  
DISEÑO METODOLÓGICO

## **4.0 DISEÑO METODOLÓGICO**

### **4.1. TIPO DE ESTUDIO.**

El tipo de estudio es concurrente y experimental.

El estudio concurrente es aquel donde se evalúa un método analítico el cual ha sido utilizado repetidamente y es empleado como herramienta de análisis, se tiene suficiente evidencia de su funcionamiento para asegurar que la validación será satisfactoria.

El estudio experimental se basa en ensayos repetitivos realizados en un laboratorio y el control de variables.

### **4.2. INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

1. Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
2. Consulta bibliográfica en Laboratorios Terapéuticos Medicinales S.A. de C.V. (Grupo TERAMED).
3. Consulta en internet.

### **4.3. PARTE EXPERIMENTAL.**

La investigación experimental se desarrolló en el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), Universidad de El Salvador.

#### **4.4. PARAMETROS A EVALUAR DE ACUERDO A LAS GUÍAS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS DE LA AOAC Y LA NORMA ISO 16140**

Tener en cuenta: para el cálculo de parámetros estadísticos en microbiología, los datos se deben transformarse a logaritmo base 10 para normalizar la distribución.

##### **4.4.1. LÍMITE DE DETECCIÓN <sup>(1)</sup>**

El parámetro se evaluó utilizando diferentes niveles de concentración de inóculo. Se inició con una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/mL, de la cual se realizaron diluciones para determinar el nivel de inóculo más bajo que puede detectar el método alternativo. Este parámetro fue evaluado por duplicado para cada nivel de dilución de microorganismo (ver esquema de dilución en protocolo de validación).

##### **4.4.2. PRECISIÓN <sup>(1)</sup>**

Se requiere estimar:

- El coeficiente de variación (CV) de la Repetibilidad del método
- El coeficiente de variación (CV) de la Reproducibilidad entre analistas.

La precisión se expresa matemáticamente por la desviación estándar o preferiblemente por el coeficiente de variación.

Se evaluaron tres estudios simultáneos para su determinación:

- a) **Repetibilidad:** un analista realizó por quintuplicado una misma muestra en tres niveles de concentración de microorganismo [alto ( $3 \times 10^3$  UFC/mL), medio (30 UFC/mL), bajo ( $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL)] y un control sin inocular.

Los datos obtenidos, son transformados a logaritmo base 10 para cada valor del NMP, encontrando la  $S_r$  y  $CV_r$  para cada nivel de inóculo mediante la fórmula:

$$CV_r (\%) = \frac{S_r}{\bar{y}} * 100 \quad \bar{y} = \frac{\sum y}{n} \quad CV_r (\%) \leq 2 \text{ para análisis microbiológico}$$

Donde:

$S_r$  = Desviación estándar de la repetibilidad.

$\bar{y}$  = Promedio de los valores individuales de Log base 10 NMP.

- b) **Reproducibilidad:** tres analistas realizaron por quintuplicado una misma muestra en los tres niveles de concentración de microorganismo especificados [alto ( $3 \times 10^3$  UFC/mL), medio (30 UFC/mL), bajo ( $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL)] y un control sin inocular.

Los datos obtenidos, son transformados a logaritmo base 10 para cada valor del NMP, encontrando la  $S_R$  y  $CV_R$  para cada nivel de inóculo; mediante la fórmula:

$$CV_R (\%) = \frac{S_R}{\bar{y}} * 100 \quad \bar{y} = \frac{\sum y}{n} \quad CV_R (\%) \leq 2 \text{ para análisis microbiológico}$$

Donde:

$S_R$  = Desviación estándar de la reproducibilidad.

$\bar{y}$  = Promedio de los valores de Log base 10 NMP.

c) **Falsos negativos:** Se inocularon simultáneamente 10 mL de una suspensión estandarizada de *Proteus vulgaris*, a una concentración de  $3 \times 10^4$  células/mL con 10 células aisladas de *E. coli* <sup>(14)</sup> en 10 tubos con 10 mL de caldo LMX doble concentración <sup>(2)</sup>. Se incubaron los tubos a 35 °C durante 24 horas. La presencia de color azul verdoso indica prueba positiva para coliformes totales y fluorescencia indica prueba positiva para *E. coli*.

#### 4.4.3. EXACTITUD <sup>(1)</sup>

Se requiere estimar:

- Si existe diferencia en la exactitud entre el método alternativo y el de referencia.
- Comparar si la diferencia entre las medias del método a validar y referencia es significativa.

**Procedimiento:** Se analizó una misma muestra por el método a validar (Fluorocult<sup>®</sup>) y por el método de referencia (oficial) utilizando tres niveles de concentración de microorganismo especificados [alto ( $3 \times 10^3$  UFC/mL), medio (30 UFC/mL), bajo ( $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL)] y un control sin inocular en tres determinaciones repetidas de cada nivel comparando estadísticamente las medias del método a validar y método de referencia, aplicando la t de Student. Una vez encontrado el valor de la t experimental se compara con el valor de t de tablas; donde  $t_{exp} < t_{tab}$  para n-1 grados de libertad, y un 95 % de confianza con un riesgo de  $\alpha = 0.05$  <sup>(1)</sup>.

#### 4.4.4. INCLUSIVIDAD <sup>(7)</sup>

Para su evaluación se utilizaron cepas puras de microorganismos pertenecientes al grupo coliforme total, potencialmente competitivos para hidrolizar el cromógeno como es la bacteria *Enterobacter cloacae* <sup>(1)</sup>, en el cual se inocularon 10 mL de una suspensión de la bacteria a una concentración de  $3 \times 10^4$  células/mL en cada uno de 10 tubos conteniendo 10 mL de caldo Fluorocult<sup>®</sup> de doble concentración, se incubaron los tubos por 24 horas a  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Después del período de incubación, se examinaron los tubos que desarrollaron una coloración azul-verdosa (reacción positiva para coliformes totales), luego se expuso aquellos tubos que presentaron cambio de color a luz UV, y se confirmó con el reactivo de Kovacs que produce un anillo violeta.

#### 4.4.5. EXCLUSIVIDAD <sup>(7)</sup>

Para su evaluación se utilizaron cepas puras de microorganismos específicos diferentes al grupo coliforme total (*Pseudomona aeruginosa*) que no sean competitivos para hidrolizar tanto el cromógeno ni el fluorogéno presentes en el Fluorocult<sup>®</sup>. Inocular 10 mL de la suspensión de *Pseudomona aeruginosa* (a una concentración aproximada de  $3 \times 10^4$  células/mL) <sup>(1)</sup> en cada uno de 10 tubos conteniendo 10 mL de caldo Fluorocult<sup>®</sup> de doble concentración. Incubar por 24 horas a  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Después del período de incubación examinar los tubos que desarrollen una coloración azul-verdosa, exponerlos a la luz UV. Realizar el ensayo por duplicado tanto para exclusividad e inclusividad.

#### **4.4.6. ENSAYO DE LA TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLES (NMP)**

##### **4.4.6.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

El inóculo se preparó usando una cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739, transferir la bacteria por medio de estriado a una placa con agar nutritivo e incubar a 37 °C x 24 horas, tomar colonias aisladas con un asa estéril y sembrar en un tubo con agar nutritivo inclinado, luego incubar a 37 °C x 24 horas. Después del tiempo de incubación adicionar 2 mL de solución salina y dos perlas de ebullición estéril. Verter el contenido en una botella de Roux con agar nutritivo e incubar 37 °C x 24 horas. Lavar el contenido con 15 mL de solución salina estéril por arrastre del microorganismo con perlas de vidrio estéril y recoger el contenido en un erlenmeyer estéril.

##### **4.4.6.2. ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO**

La concentración inicial de trabajo de la bacteria *Escherichia coli* ATCC 8739, se obtuvo mediante la comparación de turbiedad semejante al estándar McFarland  $3 \times 10^8$  UFC/mL (Ver anexo 2) y por análisis espectrofotométrico a 584 nm. Para la estandarización del inóculo se procedió de la siguiente manera:

- Medir y adicionar 0.1 mL de solución de Cloruro de Bario al 1% y 9.9 mL de Ácido Sulfúrico al 1% v/v en un tubo de ensayo con tapón de rosca para obtener el patrón McFarland equivalente a una concentración bacteriana de  $3 \times 10^8$  UFC/mL.

- Leer en aparato espectrofotómetro UV/Vis a una longitud de onda de 584 nm utilizando solución salina como blanco.
- Preparar la suspensión de *Escherichia coli* ATCC8739 leer en equipo espectrofotómetro UV/ Vis. a 584 nm y llevarla a una transmitancia similar al patrón McFarland  $3 \times 10^8$ /mL utilizando solución salina como blanco.
- Repetir por triplicado para obtener la media de la transmitancia de la suspensión de bacteria.

#### 4.4.6.3. PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DEL INÓCULO

Del inóculo de *Escherichia coli* ATCC8739 estandarizado con el patrón Macfarlan equivalente a una concentración bacteriana de  $3 \times 10^8$  UFC/mL, se midió 1 mL con pipeta volumétrica y se adicionó en un tubo con 9 mL de agua estéril, para obtener una concentración de  $3 \times 10^7$  UFC/mL. Luego se transfirió de este nivel de inóculo 0.1 mL a otro tubo de ensayo con 9.9 mL de agua estéril, ( $3 \times 10^5$  UFC/mL). De igual forma se realizó otra dilución para obtener una concentración de  $3 \times 10^3$  UFC/mL (nivel alto). Posteriormente se midió 0.1 mL de esta dilución y se agregó a un tubo que contiene 9.9 mL de agua estéril, (30 UFC/mL nivel medio), se midió 0.1 mL de esta dilución y se añadió en otro tubo con 9.9 mL de agua estéril para obtener el nivel bajo de concentración de  $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL (nivel bajo). Finalmente se agitó cada dilución 25 veces a intervalos de 7 segundos.

#### 4.4.6.4. TÉCNICA DE LOS TUBOS MÚLTIPLES (NMP), UTILIZANDO EL SUSTRATO CROMOGÉNICO Y FLUOROGÉNICO (FLUOROCULT® CALDO LMX)

1. Para cada uno de los niveles de concentración de inóculos [alto ( $3 \times 10^3$  UFC/mL), medio (30 UFC/mL), bajo ( $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL)] y un control negativo se preparó una serie de 10 tubos conteniendo 10 mL de Fluorocult® de doble concentración.
2. Se identificaron los tubos anotando el número de tubo y el nivel de inóculo.
3. Luego se inocularon 10 mL de muestra contaminada artificialmente con la bacteria (*Escherichia coli* ATCC 8739) a cada tubo.
4. Posteriormente se incubaron los tubos por 24 a 48 horas a  $35 \pm 0.5$  °C.
5. La presencia de color azul verdoso indica prueba positiva para coliformes totales. La presencia de fluorescencia, utilizando lámpara de luz uv, indica prueba positiva para *Escherichia coli* y formación de un anillo color rojo al utilizar el reactivo de Indol.
6. Los resultados se interpretaron de acuerdo a la tabla de NMP (ver anexo 1).

#### 4.4.6.5. TÉCNICA DE LOS TUBOS MÚLTIPLES (NMP), UTILIZANDO EL MÉTODO CONVENCIONAL <sup>(2)</sup>

##### A) Prueba Presuntiva

1. Se inocularon 10 mL de la muestra artificialmente contaminada para cada nivel de inóculo [alto ( $3 \times 10^3$  UFC/mL), medio (30 UFC/mL), bajo ( $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL)] y un control negativo en caldo lauril triptosa con campanas de Durham, para detectar producción de gas, Agitando enérgicamente la muestra y las diluciones 25 veces; y se mezclaron las porciones a estudiar con el medio mediante agitación suave.
2. Luego se incubaron a  $35^{\circ}$  C por  $24 \pm 2$  horas. Tras  $24 \pm 2$  horas, agitando cada tubo suavemente y observando si se produce gas o un crecimiento ácido (color amarillo), en caso contrario, reincubando y volviendo a examinar al final de  $48 \pm 3$  horas.
3. Se registró la presencia o ausencia de gas o ácido.

*Interpretación:* La aparición de gas en el vial invertido o crecimiento ácido (color amarillo) en los tubos a las  $48 \pm 3$  horas constituye una presunta reacción positiva. Los tubos con este tipo de reacción deben ser estudiados en la fase confirmatoria. La ausencia de crecimiento ácido o de formación de gas al finalizar las  $48 \pm 3$  horas de incubación indica una reacción negativa. El límite arbitrario de 48 horas para la observación excluye sin ninguna duda a los miembros ocasionales del grupo coliforme que crecen de manera muy lenta.

## **B) Fase Confirmativa**

1. Se llevó a la fase de confirmación todos los tubos primarios en los que apareció cualquier cantidad de gas o de crecimiento ácido a las 24 horas de incubación. Si se observa fermentación activa o un crecimiento ácido antes de las 24 horas, los tubos se llevan al medio de confirmación sin esperar a que trascurren las 24 horas. Si hay otros tubos primarios con crecimiento ácido después de 24 horas de incubación, también se llevan a la fase confirmatoria.
2. Se agitaron suavemente los tubos primarios que mostraron gas o crecimiento ácido suficiente para que se produzca una resuspensión de los microorganismos.
3. Con un asa estéril de 3 mm de diámetro, se transfirió una asada completa de cultivo al tubo de fermentación que contiene el medio Verde brillante de lactosa bilis. De esta manera se repitió la operación en todos los tubos posiblemente positivos.
4. Incubar el medio verde brillante de lactosa bilis a  $35 \pm 0.5$  °C durante  $48 \pm 3$  horas.

*Interpretación:* La formación de cualquier cantidad de gas en el vial invertido en el medio de fermentación verde brillante de lactosa bilis a las  $48 \pm 3$  horas constituye un resultado positivo en la fase confirmatoria. Calcular el valor del Número Más Probable a partir del número de tubos positivos, según las tablas de NMP. (Ver anexo 1)

#### 4.4.6.6. PRUEBA PARA COLIFORMES FECALES (MEDIO EC) (2)

1. Se estudiaron todos los tubos de fermentación presuntivos que mostraron alguna cantidad de gas o fuerte crecimiento durante las 48 horas de incubación en la fase de confirmación.
2. Agitar suavemente los tubos de fermentación que mostraron gas en el vial invertido. Con un asa estéril de metal, pasar el cultivo de cada tubo de fermentación al medio EC.
3. Posteriormente se incubaron los tubos con medio EC inoculados en un baño de agua a  $44.5 \pm 0.2$  °C durante  $24 \pm 2$  horas. El baño de agua debe tener una profundidad suficiente como para que el agua del baño este a un nivel superior al que tiene el medio en los tubos.

*Interpretación:* Se considera como reacción positiva para coliformes fecales la aparición de gas en el medio EC a las 24 horas o menos de incubación. La falta de gas y a veces de crecimiento, constituye un resultado negativo, que indica que el origen de los microorganismos no es intestinal. El NMP en los tubos con medio EC positivos se calcula de igual forma descrita en anexo 1.

CAPITULO V  
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1. Límite de detección

Tabla N° 1: Resultados del ensayo para determinar el límite de detección del método fluorogénico.

[ ] Inóculo UFC/mL	Repetición 1 Nº de tubos positivos	Repetición 2 Nº de tubos positivos
$3 \times 10^3$	10	10
30	10	10
$3 \times 10^{-1}$	10	10
$3 \times 10^{-3}$	0	0

El método alternativo se sometió a prueba utilizando diferentes niveles de concentración; partiendo de una concentración bacteriana de  $3 \times 10^8$  la cual se diluyó hasta obtener que el mínimo nivel detectable por el método es de  $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL. A partir de este ensayo se establecieron los niveles alto, medio y bajo para evaluar los diferentes parámetros de validación; donde el nivel bajo es el límite de detección del método alternativo, el nivel medio y alto pueden ser aproximadamente 1 o 2 unidades de log base 10 respectivamente. Por tal motivo se eligió una concentración alta de  $3 \times 10^3$  UFC/mL y concentración media de 30 UFC/mL ya que difieren de 2 unidades logarítmicas entre ellas.

## 5.2. Precisión

### 5.2.1. Repetibilidad

Tabla N° 2: Resultados del ensayo para repetibilidad del método fluorogénico.

[ ] Inóculo UFC/mL	Repetición 1 N° de tubos positivos	Repetición 2 N° de tubos positivos	Repetición 3 N° de tubos positivos	Repetición 4 N° de tubos positivos	Repetición 5 N° de tubos positivos
$3 \times 10^3$	10	10	10	10	10
30	10	10	10	10	10
$3 \times 10^{-1}$	10	10	10	10	9

Tabla N° 3: Valores del NMP para el ensayo de la repetibilidad del método fluorogénico.

[ ] Inóculo UFC/mL	Repetición 1 NMP/100 mL	Repetición 2 NMP/100 mL	Repetición 3 NMP/100 MI	Repetición 4 NMP/100 mL	Repetición 5 NMP/100 mL
$3 \times 10^3$	23.01	23.01	23.01	23.01	23.01
30	23.01	23.01	23.01	23.01	23.01
$3 \times 10^{-1}$	23.01	23.01	23.01	23.01	23.00

Tabla N° 4: Valores de NMP/100 mL para repetibilidad del método fluorogénico transformados a logaritmo base 10.

[ ] Inóculo UFC/mL	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5
$3 \times 10^3$	1.3619	1.3619	1.3619	1.3619	1.3619
30	1.3619	1.3619	1.3619	1.3619	1.3619
$3 \times 10^{-1}$	1.3619	1.3619	1.3619	1.3619	1.3617

Tabla N° 5: Estimación de la desviación estándar y coeficiente de variación para la repetibilidad del método fluorogénico.

[ ] de inóculo UFC/mL	n	X	S	CV %
$3 \times 10^3$	5	1.361900	0.0	0.0
30	5	1.361900	0.0	0.0
$3 \times 10^{-1}$	5	1.361860	0.0000894	0.0066
<b>Coeficiente de variación promedio</b>				<b>0.0022</b>

Ver anexo 8-9.

Discusión de resultados repetibilidad del método:

Para este fin fueron utilizados tres niveles de concentración de microorganismo. En donde se obtuvo un coeficiente de variación promedio para la repetibilidad de 0.0022% esto como resultados de cinco ensayos repetidos de cada nivel de inóculo efectuado en las mismas condiciones, por un solo analista.

### 5.2.2. Reproducibilidad

Tabla N° 6: Valores del NMP para la reproducibilidad del método fluorogénico realizado por el analista 1.

[ ] Inóculo UFC/mL	Repetición 1 NMP/100 mL	Repetición 2 NMP/100 mL	Repetición 3 NMP/100 mL	Repetición 4 NMP/100 mL	Repetición 5 NMP/100 mL
$3 \times 10^3$	23.01	23.01	23.01	23.01	23.00
30	23.01	23.01	23.01	23.00	23.01
$3 \times 10^{-1}$	23.00	23.01	23.01	23.01	23.00

Ver anexo 7

Tabla N° 7: Valores de NMP para reproducibilidad del método fluorogénico realizado por el analista 1, transformado a Log base 10.

[ ] Inóculo UFC/mL	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5
$3 \times 10^3$	1.3619	1.3619	1.3619	1.3619	1.3617
30	1.3619	1.3619	1.3619	1.3617	1.3619
$3 \times 10^{-1}$	1.3617	1.3619	1.3619	1.3619	1.3617

Tabla N° 8: Estimación de la desviación estándar y coeficiente de variación para la reproducibilidad del método fluorogénico realizado por analista 1.

[ ] de inóculo UFC/mL	n	X	S	CV %
$3 \times 10^3$	5	1.361860	0.0000894	0.0066
30	5	1.361860	0.0000894	0.0066
$3 \times 10^{-1}$	5	1.361820	0.0001095	0.0080
<b>Coeficiente de variación promedio del analista 1</b>				<b>0.0070</b>

Tabla N° 9: Valores del NMP para la reproducibilidad del método fluorogénico realizado por el analista 2.

[ ] Inóculo UFC/mL	Repetición 1 NMP/100 mL	Repetición 2 NMP/100 mL	Repetición 3 NMP/100 mL	Repetición 4 NMP/100 mL	Repetición 5 NMP/100 mL
$3 \times 10^3$	23.01	23.01	23.01	23.01	23.01
30	23.00	23.01	23.01	23.01	23.01
$3 \times 10^{-1}$	23.00	23.01	23.01	23.00	23.01

Ver anexo 7

Tabla N° 10: Valores de NMP para reproducibilidad del método fluorogénico de analista 2, transformados a Log base 10.

[ ] Inóculo UFC/mL	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5
$3 \times 10^3$	1.3619	1.3619	1.3619	1.3619	1.3619
30	1.3617	1.3619	1.3619	1.3619	1.3619
$3 \times 10^{-1}$	1.3617	1.3619	1.3619	1.3617	1.3619

Tabla N° 11: Estimación de la desviación estándar y coeficiente de variación para la reproducibilidad del método fluorogénico realizado por analista 2.

[ ] de inóculo UFC/mL	n	X	S	CV %
$3 \times 10^3$	5	1.361900	0.0	0.0
30	5	1.361860	0.0000894	0.0066
$3 \times 10^{-1}$	5	1.361820	0.0001095	0.0080
<b>Coeficiente de variación promedio del analista 2</b>				<b>0.0048</b>

Tabla N° 12: Valores del NMP para la reproducibilidad del método fluorogénico realizado por el analista 3.

[ ] Inóculo UFC/mL	Repetición 1 NMP/100 mL	Repetición 2 NMP/100 mL	Repetición 3 NMP/100 mL	Repetición 4 NMP/100 mL	Repetición 5 NMP/100 mL
$3 \times 10^3$	23.01	23.00	23.01	23.01	23.01
30	23.00	23.01	23.01	23.01	23.01
$3 \times 10^{-1}$	23.01	23.01	23.01	23.01	23.00

Ver anexo 7

Tabla N° 13: Valores de NMP para reproducibilidad del método fluorogénico realizados por el analista 3, transformados a Log base 10.

[ ] Inóculo UFC/mL	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5
$3 \times 10^3$	1.3619	1.3617	1.3619	1.3619	1.3619
30	1.3617	1.3619	1.3619	1.3619	1.3619
$3 \times 10^{-1}$	1.3619	1.3619	1.3619	1.3619	1.3617

Tabla N° 14: Estimación de la desviación estándar y coeficiente de variación para la reproducibilidad del analista 3.

[ ] de inóculo UFC/mL	n	X	S	CV %
$3 \times 10^3$	5	1.361860	0.0000894	0.0066
30	5	1.361860	0.0000894	0.0066
$3 \times 10^{-1}$	5	1.361860	0.0000894	0.0066
<b>Coefficiente de variación promedio del analista 3</b>				<b>0.0066</b>

Ver anexo 9

Tabla N° 15: Coeficiente de variación promedio para cada una de los niveles de inóculo del microorganismo.

[ ] de inóculo UFC/mL	Analista 1	Analista 2	Analista 3	CV promedio
$3 \times 10^3$	0.0066	0.0	0.0066	0.0044
30	0.0066	0.0066	0.0066	0.0066
$3 \times 10^{-1}$	0.0080	0.0080	0.0066	0.0075

Discusión de resultados reproducibilidad de los analistas:

Este parámetro se evaluó para determinar la variabilidad de los resultados entre diferentes analistas; sobre tres niveles de concentración de microorganismo y cinco determinaciones repetidas de cada nivel; obteniéndose para la concentración de  $3 \times 10^3$  UFC/mL un coeficiente de variación promedio de

0.0044%; para el nivel de inóculo medio 30 UFC/mL el coeficiente de variación promedio fue de 0.0066% y para la concentración baja  $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL, el coeficiente de variación promedio obtenido es de 0.0075%. Esto como resultado de cinco ensayos realizados por tres analistas diferentes para cada nivel de inóculo.

### 5.2.3. Falsos negativos

Cuadro N° 2: Resultados promedio de falsos negativos para la técnica de tubos múltiples utilizando caldo LMX.

No Tubos inoculados con <b><i>E. coli</i></b> más <b><i>Proteus vulgaris</i></b> [ $3 \times 10^4$ UFC/ml]	Viraje de Color (Amarillo – verde azulado)	Formación de Gas	Fluorescencia	Prueba del Indol
1	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
2	Positiva	Negativo	Positiva	Positiva
3	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
4	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
6	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
7	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
8	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
9	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
10	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Por medio de este estudio se examinaron los resultados falsos negativos del Método del NMP usando un medio fluorogénico, que son ocasionados por la interferencia de células de ***Proteus vulgaris*** en la producción de gas de la ***Escherichia coli***, en el cual 2 de 10 tubos inoculados simultáneamente con las dos bacterias presentaron ausencia de gas; sin embargo, la presencia de ***Escherichia coli*** fue detectada por la fluorescencia al exponer los tubos a luz UV y formación de un anillo rojo al utilizar el reactivo de indol.

### 5.3. Exactitud

Método a validar (1): NMP utilizando el medio de cultivo Fluorocult®.

Método de referencia (2): NMP según la APHA utilizando medios de cultivo convencionales.

Tabla N° 16: Resultados del ensayo para exactitud del método fluorogénico.

[ ] Inóculo UFC/mL	Método 1 a Validar N° Tubos Positivos	Método 2 Referencia N° Tubos Positivos
3X10 <sup>3</sup>	10	10
	10	10
	10	10
30	10	9
	10	10
	10	10
3x10 <sup>-1</sup>	10	9
	10	10
	9	10

Tabla N° 17: Valores del NMP para el ensayo de la exactitud del método fluorogénico.

[ ] Inóculo UFC/mL	Método 1 a validar NMP/100 mL	Método 2 Referencia NMP/100 mL	Método 1 a validar Log NMP/100 mL	Método 2 Referencia Log NMP/100 mL
3X10 <sup>3</sup>	23.01	23.01	1.3619	1.3619
	23.01	23.01	1.3619	1.3619
	23.01	23.01	1.3619	1.3619
30	23.01	23.00	1.3619	1.3617
	23.01	23.01	1.3619	1.3619
	23.01	23.01	1.3619	1.3619
3x10 <sup>-1</sup>	23.01	23.00	1.3619	1.3617
	23.01	23.01	1.3619	1.3619
	23.00	23.01	1.3617	1.3619

Cuadro N° 3: Resumen del procedimiento de la prueba t para dos muestras relacionadas.

Prueba para muestras Relacionadas								
Método alternativo - Método Oficial	Diferencia Relacionada							
	Diferencia Significativa	S	Error típico de la media	95% Intervalo de confianza de la Diferencia		t	Grados de Libertad	Nivel Crítico bilateral
				Bajo	Alto			
	.0000222	.0000667	.0000222	-0.000029	0.00007	<b>1.0</b>	8.0	0.347

Ver anexo 10-11.

Tabla N° 18: Comparación de medias de método a validar y método de referencia para la exactitud del método del NMP.

	Método	Media	N° de muestras	Desviación estándar
Par 1	<b>Método Alternativo</b>	1.361878	9	0.0000667
	<b>Método Referencia</b>	1.361856	9	0.0000882

Discusión de resultados determinación de exactitud:

Fue determinada con el empleo del programa estadístico SPSS v. 14.0 para pares de muestras relacionadas, evaluando nueve determinaciones sobre tres niveles de concentración, es decir, tres niveles de concentraciones de microorganismo  $3 \times 10^3$ , 30, y  $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL y tres repeticiones repetidas de cada concentración; donde se obtuvo una t de Student de 1.0, la media del método alternativo fue de 1.361878 y la media del método convencional de 1.361856 con una diferencia significativa de 0.000022. Por este test estadístico se observa que no existe diferencia significativa entre las medias de los dos métodos con un  $\alpha = 0.05$ , y la t experimental es menor que la t de tablas (1.860).

#### 5.4. Inclusividad

Cuadro N° 4: Resultados de la inclusividad del método fluorogénico.

No. Tubos Inoculados con <i>Enterobacter cloacae</i> [3X10 <sup>4</sup> ufc/mL]	Viraje de Color (Amarillo – verde azulado)	Formación de Gas	Fluorescencia	Prueba del Indol
1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
3	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
4	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
5	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
6	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
7	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
8	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
9	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
10	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

La Inclusividad del método fue determinada por medio de la actividad enzimática en el cual la bacteria *Enterobacter cloacae* ocasiona un cambio de coloración en el medio debido a la hidrolización del cromógeno por la acción de la enzima  $\beta$ -D-Galactosidasa; no se observa fluorescencia a las 24 horas de incubación; ni formación de anillo indólico en los 10 tubos que presentan cambio de color.

## 5.5. Exclusividad

Cuadro N° 5: Resultados de exclusividad del método fluorogénico.

No. Tubos Inoculados con <i>Pseudomona aeruginosa</i> [3X10 <sup>4</sup> ufc/mL]	Viraje de Color (Amarillo – verde azulado)	Formación de Gas	Fluorescencia	Prueba del Indol
1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Este análisis cualitativo se realizó para determinar la capacidad del método alternativo para distinguir bacterias que no son pertenecientes al grupo coliforme total; en el cual los resultados obtenidos al contaminar el medio con *Pseudomona aeruginosa* fueron negativos en cada uno de los 10 tubos, no presentándose cambio de color, ni fluorescencia, ni formación de anillo indólico.

CAPITULO VI  
DOCUMENTOS DE VALIDACIÓN



**Validación de la Prueba de Coliformes  
totales y fecales por la Técnica de Tubos  
Múltiples utilizando un medio Fluorogénico**

**CENSALUD**

## **PROTOCOLO DE VALIDACIÓN**

CIUDAD UNIVERSITARIA  
FINAL 25 AVENIDA NORTE  
SANSALVADOR, EL SALVADOR

TELEFAX N° (503) 22258826 Y 22258434  
CORREO: CEN\_SALUD\_UES@HOTMAIL.COM

Preparado por: Equipo responsable de validación Fecha: 22-10-07

Br. Magdalena Guadalupe Hernández Acosta F. \_\_\_\_\_

Br. José Remberto Cabrera Aguilar F. \_\_\_\_\_

Revisado por: Asesor de validación Fecha: 29-10-07

Lic. René Francisco Ramos Alvarenga F. \_\_\_\_\_

Aprobado por: Jefa de Laboratorio de Control de Calidad

Microbiológica CENSALUD - UES Fecha: 17-01-08

MSc. Maria Evelyn Sánchez de Ramos F. \_\_\_\_\_

**LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN SALUD  
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 2 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

## **CONTENIDO:**

### **1.- Objetivo.**

### **2.- Lugar de estudio**

### **3.- Responsabilidades.**

### **4.- Tipo de muestras**

### **5.- Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipo.**

5.1.- Medio de cultivo

5.2.- Reactivos

5.3.- Cristalería

5.4.- Equipos

### **6.- Método de análisis:**

6.1.- Aplicación

6.2.- Resumen del método

6.3.- Precauciones

6.3.1.- De seguridad

6.3.2.- Del método

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 3 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

#### 6.4.- Esquema de trabajo

6.4.1.- Preparación del inóculo

6.4.2.- Estandarización del inóculo

6.4.3.- Preparación de las diluciones del inóculo

#### 6.5.- Procedimiento general.

6.5.1.- Técnica de los tubos múltiples (NMP), utilizando caldo LMX

6.5.2.- Técnica de los tubos múltiples (NMP), utilizando el método convencional

#### 6.6.- Parámetros de evaluación

### 7.- Estudio de parámetros.

7.1.- Límite de detección

7.2.- Exactitud

7.3.- Precisión

7.4.- Exclusividad

7.5.- Inclusividad

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 4 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

## 8.- Informe técnico de validación

8.1.- Objetivo

8.2.- Tipo de estudio

8.3.- Referencia al protocolo

8.4.- Datos sobre calificación del equipo

8.5.- Resultados obtenidos

8.5.1.- Precisión

8.5.1.1.- Repetibilidad del método

8.5.1.2.- Reproducibilidad

8.5.1.3.- Falsos negativos

8.5.2.- Exactitud

8.5.3.- Exclusividad

8.5.4.- Inclusividad

8.6.- Evaluación de resultados

8.7.- Registro de control de temperaturas y humedad de áreas.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 5 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

### 1.- OBJETIVO.-

El objetivo del siguiente protocolo es el de asegurar el proceso de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico según las especificaciones de las Guías de Validación de Métodos Microbiológicos Cualitativos y Cuantitativos de la AOAC INTERNATIONAL y la norma ISO 16140, para comprobar que el método es capaz de cumplir de forma consistente y repetitiva las especificaciones establecidas.

### 2.- LUGAR DE ESTUDIO

Laboratorios de Control de Calidad Microbiológica; Centro de Investigación y Desarrollo en Salud; Universidad de El Salvador.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 6 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

### 3.- RESPONSABLES

Equipo responsable de validación:

- Br. Magdalena Guadalupe Hernández Acosta
- Br. José Remberto Cabrera Aguilar

Jefatura del Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico:

- MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

Asesor de validación:

- Lic. René Francisco Ramos Alvarenga

### 4.- TIPO DE MUESTRA (ISO 16140)

Muestra de agua estéril artificialmente contaminada con microorganismo de prueba *Escherichia coli* ATCC 8739 evaluada en tres niveles de concentración de microorganismo (alta, medio y bajo) y un control sin inocular (el tubo control lleva agua estéril).

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 7 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

## 5.- MATERIAL Y EQUIPO

### 5.1.- Medios de cultivo

Caldo	Marca	Lote	Código
Caldo BRILLA	MERCK	VM891854 220	C-2
Caldo EC	MERCK	VM083965 328	C-3
Caldo LMX	MERCK	VM452420 523	C-7
Caldo LST	MERCK	VM0551660315	C-6

Agar	Marca	Lote	Código
Agar Plate Count	MERCK	VM25353 427	A13-2
Agar TSA	MERCK	VM511958 551	A18-2
Agar Nutritivo	OXOID	514899	---

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 8 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

### 5.2.- Reactivos

Reactivo	Marca	Lote	Código
Ácido Sulfúrico 98%	FALMAR	C01C15	R-6
Cloruro de Sodio	MERCK	K29779364 138	R45-2
Cloruro de Bario	--	--	AC-5

### 5.3.- Cristalería

Material	Volumen
▪ Pipetas de Morh	1, 10 mL
▪ Balón Volumétrico	50.0 mL y 100.0 mL
▪ Probetas	10, 100, 500, 1000 mL
▪ Puntas plásticas para pipeteador	10, 100 µL
▪ Botella de Roux	---
▪ Beakers	50, 100 mL
▪ Erlenmeyer	100, 250, 500 mL

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 9 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

#### 5.4.- Equipos

Equipo	Marca	Serie	Modelo	T ° C
Autoclave	SELECTA	0412463	----	120 ° C
Balanza Semianalítica	SARTORIUS	13603713	BL600	----
Estufa	RAYPA	13126	DO-90	160 ° C
Estufa	RAYPA	13124	DO-90	160 ° C
Incubadora	SELECTA	0412396	----	35 ± 0.5 ° C
Desmineralizador	SMEG	202-700104	WP300	----
Baño María	RAYPA	19300	----	45 ± 0.5 ° C
Flujo Laminar	TELSTAR	14313	BV-100	----
Espectrofotómetro	SHIMADZU	A109140016 78	UV mini - 1240	----
Pipeteador	BIOHIT proline XL	YP15124	----	----
Micropipeteador	BIOHIT proline	AS39129	----	----

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 10 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

## 6.- MÉTODO DE ANÁLISIS

### 6.1.- Aplicación

La prueba estándar para el grupo coliforme puede realizarse mediante la técnica de fermentación en tubos múltiples, ya sea utilizando medios de cultivo tradicionales o medios cromogénicos-fluorogénicos como el caldo LMX, ambos son aplicables para el análisis de varios de tipos aguas para determinar el grado de contaminación de estas con coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*.

### 6.2.- Resumen del método

Técnica de los tubos múltiples utilizando medios tradicionales: Se basa en la capacidad de la *Escherichia coli*, en fermentar la lactosa, con producción de gas y ácido en 48 horas a 35° C. Se pueden utilizar medios de cultivo como el caldo lactosado pero es muy susceptible a contaminarse por lo que se prefiere utilizar el caldo LST en un tubo con un vial invertido para atrapar el gas que produce la bacteria al fermentar la lactosa.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 11 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

Técnica de los tubos múltiples utilizando medios cromogénicos-fluorogénicos:

La enzima  $\beta$ -glucoronidasa que es producida por la bacteria *Escherichia coli* es capaz de hidrolizar el MUG, ocasionando una fluorescencia en el caldo bajo la luz ultravioleta de onda larga (366 nm), la cual se considera como prueba positiva para *E. coli*.

### 6.3.- Precauciones

#### 6.3.1.- De seguridad

- Usar la indumentaria adecuada al ingresar al laboratorio donde se realiza el ensayo
- Usar protección personal al realizar los ensayos con bacterias como son guantes, mascarilla, gorro y gafas.
- Sanitizar el área de trabajo antes y después de utilizarlo.
- Lavarse adecuadamente las manos y las muñecas antes y especialmente después de trabajar en los ensayos.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 12 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

### 6.3.2.- Precauciones del método

- Realizar los ensayos del método en área estéril de preferencia en cabina de flujo laminar
- Autoclavar los medios de cultivo previo a su uso y no exponer los medios de cultivo directamente al ambiente.
- Tomar en cuenta la temperatura a  $35\pm 0.5$  °C, tiempo de incubación y una adecuada agitación al realizar la técnica de tubos múltiples utilizando caldo LST, verificar si hay crecimiento o formación de burbujas en el vial invertido a las 24 horas y dejar asta las 48 horas para mayor seguridad.
- Al utilizar caldo fluorogénico LMX agitar adecuadamente e incubar a  $35\pm 0.5$  °C observar a las 24 horas.
- Al ensayar con *Escherichia coli* usando medios tradicionales, debe evitarse la contaminación cruzada con otros miembros del grupo coliforme total y fecal.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 13 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

## 6.1.- Esquema de trabajo

### 6.1.1.- Preparación del inóculo

El inóculo se prepara usando la cepa *Escherichia coli* ATCC 8739:

- a. Para obtención de un cultivo puro transferir la bacteria por medio de estriado a una placa con agar nutritivo e incubar a 37 °C x 24 horas.
- b. Tomar colonias aisladas con un asa estéril y sembrar en un tubo con agar nutritivo inclinado, luego incubar a 37 °C x 24 horas.
- c. Después del tiempo de incubación adicionar 2 mL de solución salina y dos perlas de ebullición estéril.
- d. Verter el contenido en una botella de Roux con agar nutritivo e incubar 37 °C x 24 horas.
- e. Lavar el contenido con 15 mL de solución salina estéril por arrastre del microorganismo con perlas de vidrio estéril y recoger el contenido en un erlenmeyer estéril.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 14 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

### 6.1.2.- Estandarización del inóculo

Para lograr la concentración inicial de trabajo de la bacteria *Escherichia coli* ATCC8739, utilizar del patrón McFarland  $3 \times 10^8$  UFC/mL. (Ver anexo 2).

Procedimiento:

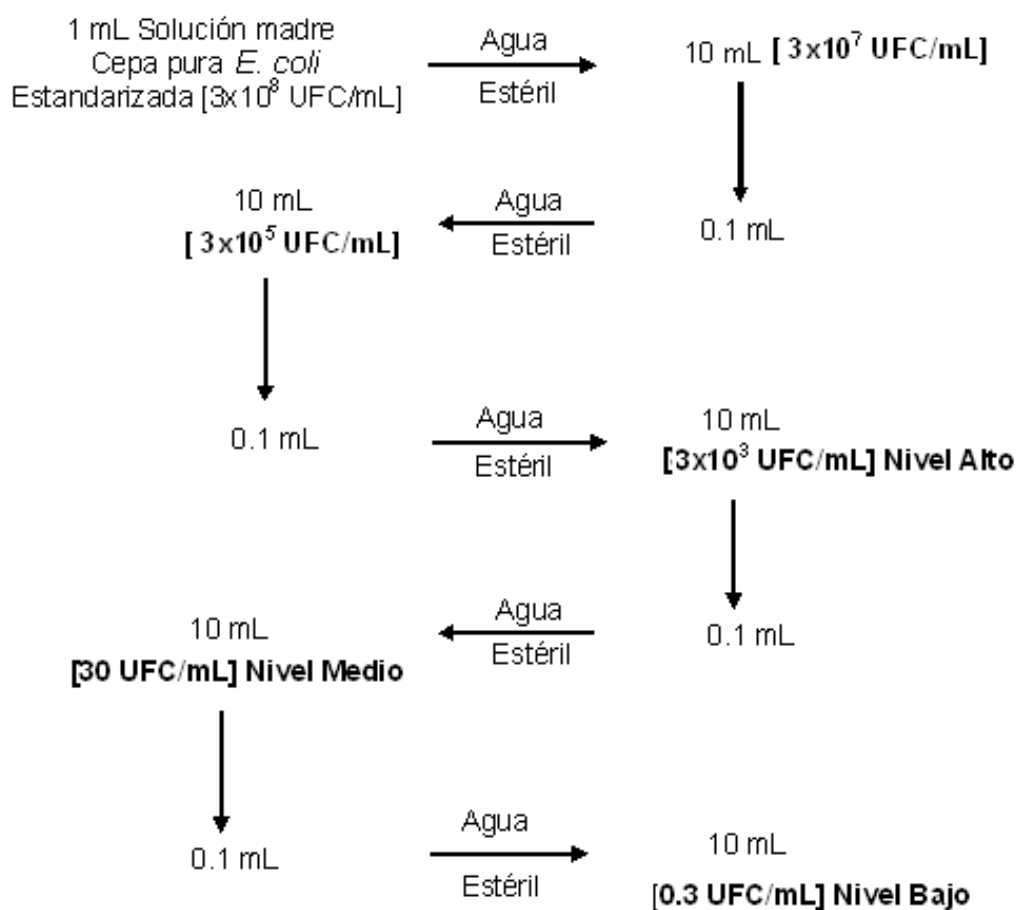
- a. Medir y adicionar 0.1 mL de solución de cloruro de bario al 1% y 9.9 mL de ácido sulfúrico al 1% en un tubo de ensayo con tapón de rosca para obtener el patrón McFarland equivalente a una concentración bacteriana de  $3 \times 10^8$  ufc/mL. Leer en equipo espectrofotómetro UV/Vis a una longitud de onda de 584 nm utilizando solución salina como blanco.
- b. Preparar la suspensión de *Escherichia coli* ATCC8739 leer en Espectrofotómetro UV/Vis a 584 nm y ajustar a una transmitancia similar al patrón McFarland  $3 \times 10^8$ /mL utilizando solución salina como blanco.
- c. Repetir por triplicado para obtener la media de la transmitancia de la suspensión de bacteria.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 15 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

### 6.1.3.- Preparación de las diluciones del inóculo



Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 16 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

## 6.2.- PROCEDIMIENTO GENERAL

### 6.2.1.- Técnica de los tubos múltiples (NMP), utilizando caldo LMX

#### Fluorocult®

- a. Para cada uno de los niveles de concentración del inóculo [alto ( $3 \times 10^3$  UFC/mL), medio (30 UFC/mL), bajo ( $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL) y un control negativo] preparar una serie de 10 tubos conteniendo 10 mL de fluorocult de doble concentración. Identificar los tubos anotando el nivel de inóculo.
- b. Inocular 10 mL de muestra contaminada artificialmente con la bacteria (*Escherichia coli* ATCC 8739) a cada tubo.
- c. Incubar los tubos por 24 a 48 horas a  $35 \pm 0.5$  °C.
- d. La presencia de color azul verdoso indica prueba positiva para coliformes totales.
- e. La presencia de fluorescencia, utilizando lámpara de luz UV, indica prueba positiva para *Escherichia coli* y formación de un anillo color rojo al utilizar el reactivo de Indol. Ver tabla de NMP en anexo 1.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 17 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

### 6.2.2.- Técnica de los tubos múltiples (NMP), utilizando el método convencional

#### A) Prueba presuntiva

1. Inocular 10 mL de la muestra artificialmente contaminada de cada uno de los niveles de inculo de microorganismo en caldo lauril triptosa con campanas de Durham, Agitar la muestra y las diluciones 25 veces; mezclar las porciones a estudiar con el medio mediante agitación suave.
2. Incubar a  $35 \pm 0.5$  °C por  $24 \pm 2$  horas. Tras  $24 \pm 2$  horas, agitar cada tubo suavemente y observar si se produce gas o un crecimiento ácido (color amarillo), en caso contrario, reincubar y volver a examinar al final de  $48 \pm 3$  horas.
3. Registrar la presencia o ausencia de gas o ácido.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 18 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

**Interpretación:** La aparición de gas en el vial invertido o crecimiento ácido (color amarillo) en el caldo a las  $48 \pm 3$  horas constituye una presunta reacción positiva. Los tubos con este tipo de reacción deben ser estudiados en la fase confirmatoria. La ausencia de crecimiento ácido o de formación de gas al finalizar las  $48 \pm 3$  horas de incubación indica una reacción negativa.

### **B) Fase confirmativa**

**Objetivo:** Esta fase se realiza para determinar la presencia de bacterias del grupo coliforme total.

1. Agitar suavemente o hacer rotar los tubos de la prueba presuntiva que muestren gas o crecimiento ácido, suficiente para producir una resuspensión de los microorganismos.
2. Con un asa estéril de 3 mm de diámetro, pasar una asada completa de cultivo al tubo de fermentación que contiene el medio verde brillante de lactosa bilis. Repetir esta operación en todos los tubos posiblemente positivos.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 19 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

3. Incubar el medio verde brillante de lactosa bilis a  $35 \pm 0.5$  °C durante  $48 \pm 3$  horas.

**Interpretación:** La formación de cualquier cantidad de gas en el vial invertido en el medio de fermentación BRILLA a las  $48 \pm 3$  horas constituye un resultado positivo. Calcular el valor del NMP a partir del número de tubos positivos, según tablas. (Ver anexo 1)

### **C) Prueba para coliformes fecales (medio EC)**

**Objetivo:** Establecer definitivamente la existencia de bacterias coliformes totales y obtener datos más seguros sobre el control de calidad del agua.

1. Estudiar todos los tubos de fermentación presuntivos que muestren alguna cantidad de gas o fuerte crecimiento durante las 48 horas de incubación en la fase de confirmación.
2. Agitar suavemente los tubos de fermentación que muestren gas en el vial invertido. Con un asa estéril de metal, pasar el cultivo de cada tubo de fermentación al medio EC.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento Normalizado de Trabajo	Número: 1
		Pág.: 20 De: 47
Título: Protocolo de Validación de la Prueba de Coliformes totales y fecales por la Técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

3. Incubar los tubos con medio EC inoculados en un baño de agua a  $44.5 \pm 0.2$  °C durante  $24 \pm 2$  horas. El baño de agua debe tener una profundidad suficiente como para que el agua del baño este a un nivel superior al que tiene el medio en los tubos.

**Interpretación:** Se considera como reacción positiva para coliformes fecales la aparición de gas en el medio EC a las 24 horas o menos de incubación. La falta de gas y a veces de crecimiento, constituye un resultado negativo, que indica que el origen de los microorganismos no es intestinal. El NMP en los tubos con medio EC positivos se calcula de igual forma descrita en la tabla del anexo 1.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 21 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

### 6.3.- PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Los criterios de validación a determinar para el método microbiológico cuantitativo del NMP son los siguientes:

- Limite de detección
- Precisión ( repetibilidad y reproducibilidad)
- Exactitud
- Inclusividad
- Exclusividad

## 7.- ESTUDIO DE PARÁMETROS.

### 7.1.- Límite de detección

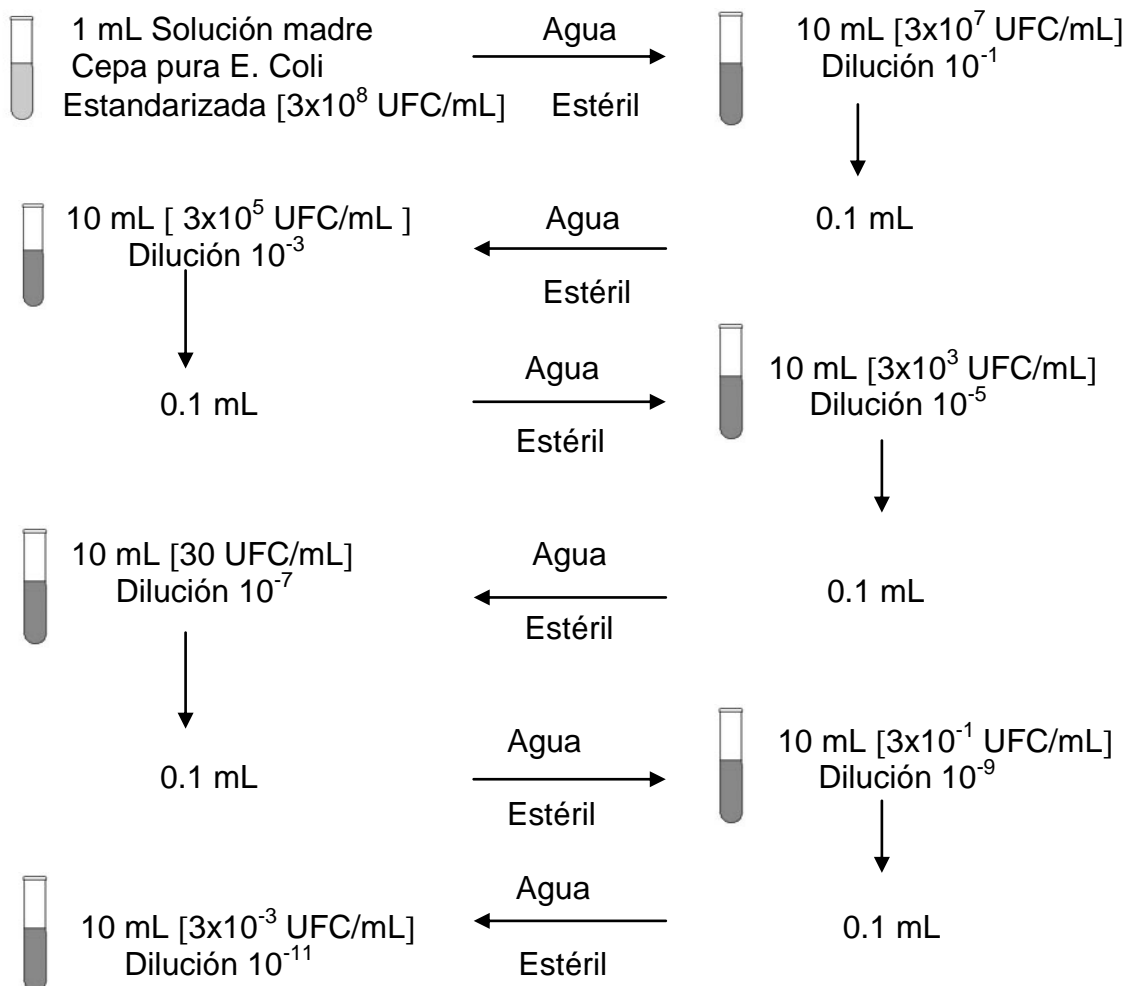
**Objetivo:** Determinar la mínima concentración de microorganismo (*Escherichia coli*) que puede ser detectada por el método, bajo condiciones experimentales definidas.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 22 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

### Procedimiento de preparación de diluciones para Límite de Detección:

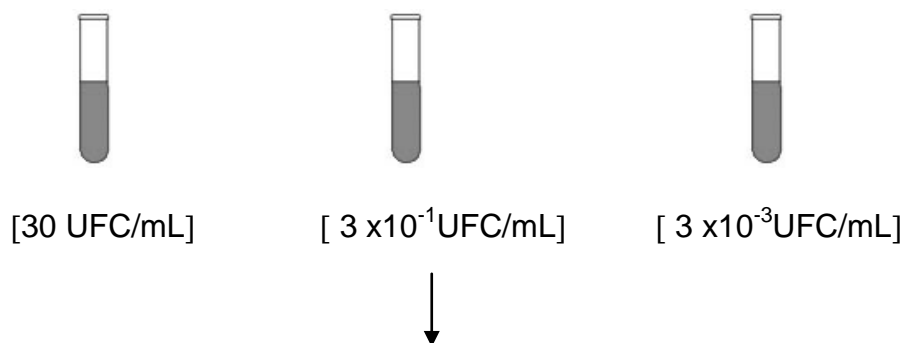


Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

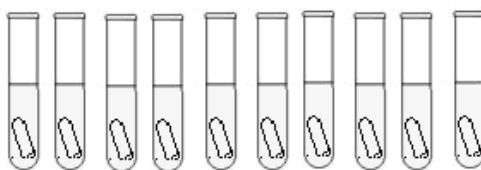
Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 23 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

Diluciones de prueba para Límite de detección:



Inocular 10 mL de la dilución en 10 tubos conteniendo 10 mL de Fluorocult doble concentración, realizar igual procedimiento para las siguientes diluciones de prueba.



Incubar los tubos por 24 a 48 horas a 35 ±0.5 °C.

**Interpretación:** la dilución más baja a la cual el medio puede detectar la presencia de *Escherichia coli*, por la presencia de fluorescencia, cuantificando el nivel de inóculo de cada dilución estandarizada previamente.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 24 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

## 7.2.- Exactitud

**Objetivo:** Determinar si existe diferencia en la exactitud entre ambos métodos por medio de la comparación de las medias del método a validar respecto al método de referencia utilizando un análisis de test de t de Student.

**Criterios de aceptación:**  $\alpha = 0.05$ , n -1 grados de libertad, t experimental debe de ser menor a t de tablas.

### Procedimiento

Un analista realiza el método a validar (fluorocult) y el método de referencia (oficial) utilizando tres niveles de concentración de microorganismo [alto ( $3 \times 10^3$  UFC/mL), medio (30 UFC/mL), bajo ( $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL) y un control negativo], en tres determinaciones repetidas de cada nivel. Ver procedimiento general (6.2.1 y 6.2.2)

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 25 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

### 7.3.- Precisión

#### 7.3.1.- Precisión: Repetibilidad del método

**Objetivo:** Determinar variabilidad mínima del método microbiológico por medio de un análisis del coeficiente de variación de la repetibilidad ( $CV_r$ ).

Criterios de aceptación:  $CV_r \leq 2\%$ .

#### **Procedimiento:**

Un analista realiza por triplicado una misma muestra en tres niveles de concentración de microorganismos [alto ( $3 \times 10^3$  UFC/mL), medio (30 UFC/mL), bajo ( $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL) y un control negativo], utilizando el caldo LMX. Ver procedimiento general (6.2.1).

#### 7.3.2.- Precisión: Reproducibilidad

**Objetivo:** Determinar variabilidad máxima del método microbiológico y la variabilidad del/s analistas frente a la muestra por medio de un análisis del Coeficiente de variación de la reproducibilidad ( $CV_R$ ).

**Criterios de Aceptación:**  $CV_R \leq 2\%$ .

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 26 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

**Procedimiento:** Tres analistas realizan por triplicado una misma muestra en tres niveles de concentración de microorganismos [alto ( $3 \times 10^3$  UFC/mL), medio (30 UFC/mL), bajo ( $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL) y un control negativo], utilizando el caldo LMX. Ver procedimiento general (6.2.1).

### 7.3.3.- Precisión: Falsos negativos

**Objetivo:** Determinar la interferencia de células de *Proteus vulgaris* en la producción de gas de la *Escherichia coli*.

**Criterios de aceptación:** Ausencia de gas en uno o más de los 10 tubos.

- b) **Procedimiento:** Inocular simultáneamente 10 mL de la suspensión de *Proteus vulgaris* (a una concentración aproximada de  $3 \times 10^4$  células por mL) <sup>(14)</sup> con 10 células aisladas de *E. coli* en 10 tubos conteniendo 10 mL de caldo LMX doble concentración <sup>(2)</sup>. Incubar los tubos a  $35 \pm 0.5$  °C durante 24 a 48 horas.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 27 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

#### 7.4.- Inclusividad

**Objetivo:** Determinar la capacidad del método alternativo para detectar diferentes microorganismos pertenecientes al grupo de las coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*.

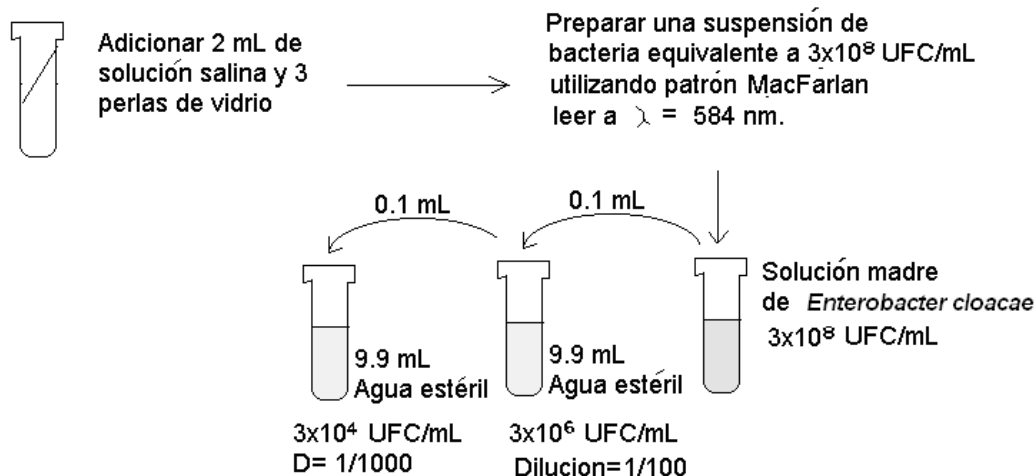
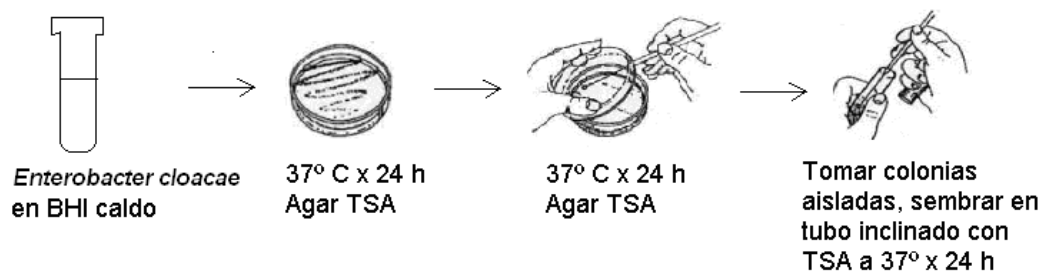
**Especificación:** El caldo LMX es capaz de detectar los géneros pertenecientes al grupo de los coliformes totales como *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Escherichia* con la capacidad de hidrolizar el cromógeno presente en el caldo con la formación de una coloración verde-azul, y fluorescencia para *Escherichia coli*.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 28 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

### Procedimiento de análisis para inclusividad:



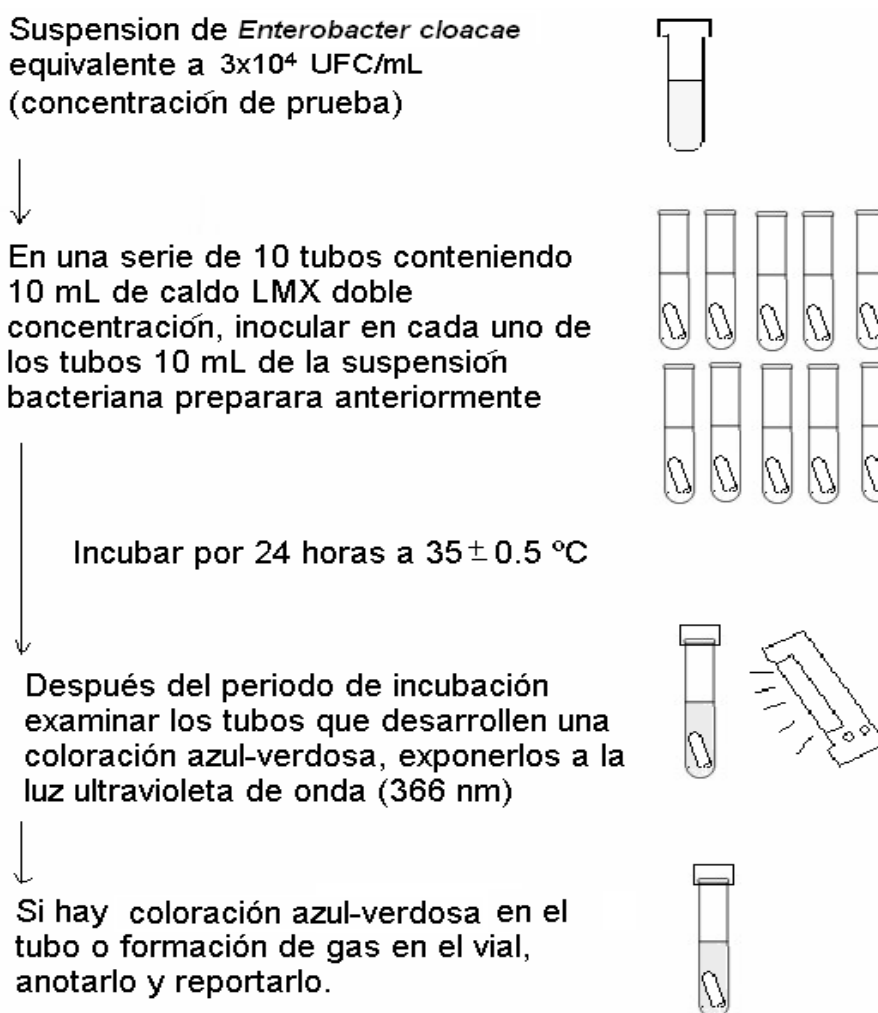
Continúa en siguiente Pág.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 29 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

Continuación de procedimiento de análisis para inclusividad:



Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 30 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

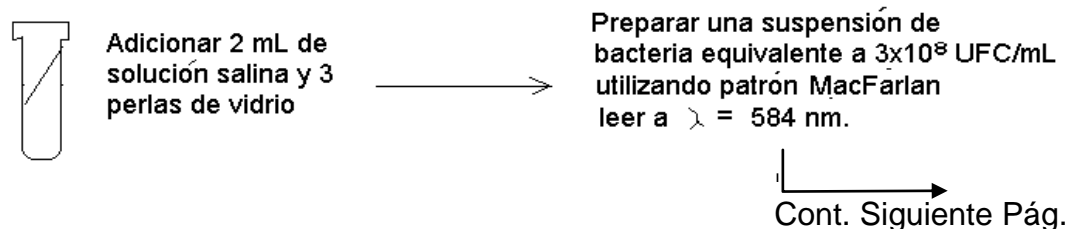
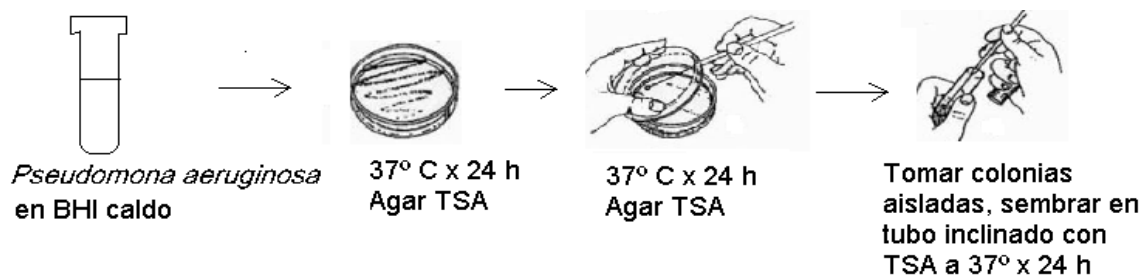
Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

### 7.5.- Exclusividad

Objetivo: Determinar la capacidad del método alternativo en el cual diferentes microorganismos que no pertenecen al grupo de los coliformes no deben ser detectados.

**Especificación:** El caldo LMX no es capaz de detectar los microorganismos que no pertenecen al grupo de los coliformes.

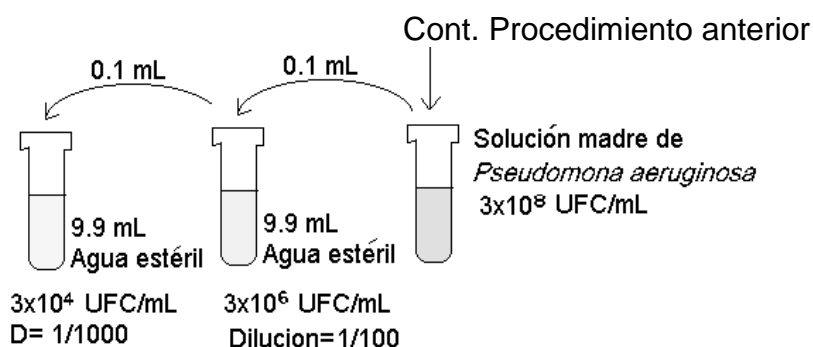
#### Procedimiento de análisis para exclusividad:



Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 31 De: 47
Título: Protocolo de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

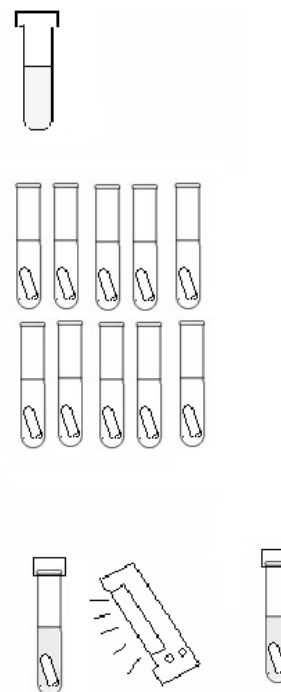


Suspensión de *Pseudomonas aeruginosa*  
Equivalente a  $3 \times 10^4$  UFC/mL  
(Concentración de prueba)

En una serie de 10 tubos conteniendo  
10 mL de caldo LMX doble concentración,  
inocular en cada uno de los tubos 10 mL  
de la suspensión preparada anteriormente

Incubar por 24 horas a  $35 \pm 0.5$  °C

Después del periodo de incubación ninguno  
de los 10 tubos debe presentar cambio en la  
coloración del medio ni fluorescencia al  
exponerlos a la luz UV.



Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 32 De: 47
Título: Informe Técnico de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Diciembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

# INFORME TÉCNICO DE VALIDACIÓN

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 33 De: 47
Título: Informe técnico de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Diciembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

## 8.- INFORME TÉCNICO

**8.1.- Objetivo:** Presentar los resultados finales de los ensayos realizados durante el proceso de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.

### 8.2.- Tipo de validación.

Validación concurrente

### 8.3.- Referencia al protocolo

Las operaciones de validación del método microbiológico han sido verificadas por el equipo de validación siguiendo cada uno de los pasos que indica el protocolo.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 34 De: 47
Título: Informe técnico de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Diciembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

#### 8.4.- Datos sobre calificación del equipo.

Los equipos y/o instrumentos utilizados en el proceso de validación son:

Equipo	Código	Fecha	Cualificación
<b>Incubadora</b>	AGU-01-214-05	23/11/07	Conforme
<b>Balanza Analítica</b>	PRE-02-038-01	23/11/07	Conforme
<b>Estufa</b>	PRE-02-172-02	23/11/07	Conforme
<b>Estufa</b>	PRE-01-172-01	23/11/07	Conforme
<b>Baño de agua</b>	AGU-01-050-03	23/11/07	Conforme
<b>Autoclave</b>	PRE-02-019-02	20/09/07	Conforme

Nota: Se anexan los certificados de calibración de los equipos para su confrontación con la tabla anterior.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 35 De: 47
Título: Informe técnico de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Diciembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

### 8.5.- Resultados obtenidos:

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	CONCLUSIÓN
<b>8.5.1.- Precisión</b>			
<b>8.5.1.1.- Repetibilidad del método.</b>	$CV_r \leq 2\%$ .	0.0022 %	Conforme
<b>8.5.1.2.- Reproducibilidad</b> Concentración alta: $3 \times 10^3$ UFC/mL	$CV_R \leq 2\%$ .	0.0066 %	Conforme
- Analista No. 1		0.0000 %	Conforme
- Analista No. 2		0.0066 %	Conforme
- Analista No. 3			
Concentración Media: 30 UFC/mL	$CV_R \leq 2\%$ .	0.0066 %	Conforme
- Analista No. 1		0.0066 %	Conforme
- Analista No. 2		0.0066 %	Conforme
- Analista No. 3			
Concentración Media: $3 \times 10^{-1}$ UFC/mL	$CV_R \leq 2\%$ .		
- Analista No. 1		0.0080 %	Conforme
- Analista No. 2		0.0080 %	Conforme
- Analista No. 3		0.0066 %	Conforme

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 36 De: 47
Título: Informe técnico de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Diciembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	CONCLUSIÓN
<b><u>8.5.1.3.- Falsos Negativos.</u></b>	Ausencia de gas en el vial invertido.	No formación de gas en el vial invertido.	Conforme
<b><u>8.5.2.- Exactitud</u></b>	$t_{exp} < t_{tab}$	1.00 < 1.860	Conforme
<b><u>8.5.3.- Exclusividad</u></b>	Diferentes microorganismos que no pertenecen al grupo no deben producir cambio de color ni fluorescencia a luz UV.	Sin cambio de color en el medio ni fluorescencia al exponerlo a luz UV.	Conforme
<b><u>8.2.4.- Inclusividad</u></b>	Diferentes microorganismos pertenecientes al mismo grupo deben producir cambio de color en el medio.	Cambio de color del medio amarillo – azul verdoso.	Conforme

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 37 De: 47
Título: Informe técnico de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Diciembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------

### 8.6.- EVALUACIÓN DE RESULTADOS

- a) De acuerdo a los estudios realizados con la utilización del medio fluorogénico los resultados de las pruebas para la precisión se encuentra conforme con respecto a la especificación del coeficiente de variación menor del 2%.
- b) En la evaluación de falsos negativos del NMP se observó que hubo inhibición de la formación de gas en al menos uno de los tubos, y no hubo inhibición de formación de color, ni fluorescencia a luz UV, por lo tanto el método se encuentra conforme de acuerdo a los resultados obtenidos.
- c) El valor de t experimental encontrado de acuerdo a los resultados del análisis es menor que t de tablas, por lo que se considera que el método cumple con el parámetro de exactitud.
- d) El microorganismo de prueba que no pertenece a la familia de los coliformes no es detectado por el método alternativo por lo que se considera conforme con la exclusividad del método.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
Título: Informe técnico de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Pág.: 38 De: 47 Departamento: Control de Calidad Microbiológico

Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1
--------------------------------------	----------------	-------------


e) Se determino por medio del ensayo de inclusividad que un microorganismo perteneciente al grupo coliforme total, fue detectado por el método, al menos en un viraje de color, por lo que se cumple con la inclusividad del método.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

Laboratorio: Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Número: 1
		Pág.: 39 De: 47
Título: Informe técnico de validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de elaboración: Noviembre 2007	Revisión N°: 1	Copia N°: 1

### 8.7.- Registros de control de temperaturas y humedad de áreas.

Redactado por: Equipo de validación	Verificado por: Lic. René Ramos Alvarenga	Aprobado por: MSc. M <sup>a</sup> Evelyn Sánchez de Ramos
--	--	--

	<b>REGISTRO DE CONTROL DE TEMPERATURA</b>		Página 40 de 47
			Vigente a partir de: Julio-07
Elaborado por: Lic. Amy Elieth Morán Rodríguez	Revisado por: MSc. María Evelyn S. de Ramos	Autorizado por: MSc. María Evelyn de Ramos	

**Equipo:** Incubadora      **Ubicación:** Laboratorio de aguas      **Código:** AGU-01-214-05  
**Mes:** Julio      **Temperatura Especificada:** 35 ± 0.5 °C

Fecha	Hora		Temperatura (°C)		Observaciones	Responsable
	a.m.	p.m.	Máxima	Mínima		
1	--	--	--	--	--	--
2	9:00	12:00	35.5	35.5	Encendido	Magdalena
3	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Magdalena
4	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Remberto
5	9:00	4:30	35.5	35.5	--	Magdalena
6	9:00	4:00	35.5	35.5	--	Remberto
7	--	--	--	--	--	--
8	--	--	--	--	--	--
9	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Magdalena
10	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Remberto
11	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Remberto
12	9:00	4:00	35.5	35.5	--	Remberto
13	9:00	4:00	35.0	35.5	--	Magdalena
14	--	--	--	--	--	--
15	--	--	--	--	--	--
16	--	--	--	--	--	--
17	--	--	--	--	--	--
18	9:00	4:00	35.5	35.0	--	Magdalena
19	9:00	3:00	35.5	35.5	--	Magdalena
20	--	--	--	--	--	--
21	--	--	--	--	--	--
22	--	--	--	--	--	--
23	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Magdalena
24	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Remberto
25	9:00	4:30	35.5	35.5	--	Remberto
26	9:00	4:00	35.5	35.5	--	Magdalena
27	9:00	4:00	35.5	35.5	--	Magdalena
28	--	--	--	--	--	--
29	--	--	--	--	--	--
30	--	--	--	--	--	--
31	9:00	4:00	35.5	35.5	Apagado	Magdalena

	<b>REGISTRO DE CONTROL DE TEMPERATURA</b>		Página 41 de 47
			Vigente a partir de: Julio-07
Elaborado por: Lic. Amy Elieth Morán Rodríguez	Revisado por: MSc. María Evelyn S. de Ramos	Autorizado por: MSc. María Evelyn de Ramos	

**Equipo:** Incubadora      **Ubicación:** Laboratorio de aguas      **Código:** AGU-01-214-05  
**Mes:** Agosto      **Temperatura Especificada:**  $35 \pm 0.5$  °C

Fecha	Hora		Temperatura (°C)		Observaciones	Responsable
	a.m.	p.m.	Máxima	Mínima		
1	--	--	--	--	--	--
2	--	--	--	--	--	--
3	--	--	--	--	--	--
4	--	--	--	--	--	--
5	--	--	--	--	--	--
6	--	--	--	--	--	--
7	9:00	12:00	35.5	35.5	Encendido	Magdalena
8	9:00	12:00	35.5	35.5	Ensayos piloto	Remberto
9	9:00	12:00	35.5	35.5		Remberto
10	9:00	4:00	35.5	35.5	--	Remberto
11	8:00	11:00	35.5	35.5	--	Magdalena
12	--	--	--	--	--	--
13	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Magdalena
14	9:30	12:00	35.5	35.5	--	Magdalena
15	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Magdalena
16	9:00	5:00	35.5	35.5	--	Remberto
17	9:00	5:00	35.5	35.5	--	Magdalena
18	8:00	11:00	35.5	35.5	--	--
19	--	--	--	--	--	--
20	9:00	3:00	35.5	35.5	--	Magdalena
21	9:00	4:00	35.5	35.5	--	Remberto
22	--	--	--	--	--	--
23	--	--	--	--	--	--
24	9:30	2:00	35.5	35.5	--	Remberto
25	--	--	--	--	--	--
26	--	--	--	--	--	--
27	8:30	12:00	35.5	35.5	--	Magdalena
28	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Magdalena
29	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Magdalena
30	9:00	4:00	35.5	35.5	--	Remberto
31	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Remberto

	<b>REGISTRO DE CONTROL DE TEMPERATURA</b>		Página 42 de 47
			Vigente a partir de: Julio-07
Elaborado por: Lic. Amy Elieth Morán Rodríguez	Revisado por: MSc. María Evelyn S. de Ramos	Autorizado por: MSc. María Evelyn de Ramos	


**Equipo:** Incubadora      **Ubicación:** Laboratorio de aguas      **Código:** AGU-01-214-05  
**Mes:** Noviembre      **Temperatura Especificada:**  $35 \pm 0.5$  °C

Fecha	Hora		Temperatura (°C)		Observaciones	Responsable
	a.m.	p.m.	Máxima	Mínima		
1	--	--	--	--	--	--
2	--	--	--	--	--	--
3	--	--	--	--	--	--
4	--	--	--	--	--	--
5	--	--	--	--	--	--
6	--	--	--	--	--	--
7	--	--	--	--	--	--
8	--	--	--	--	--	--
9	--	--	--	--	--	--
10	--	--	--	--	--	--
11	--	--	--	--	--	--
12	10:00	4:00	35.0	35.5	Encendido	Magdalena
13	9:00	1:00	35.5	35.5	--	Magdalena
14	9:00	1:00	35.5	35.0	--	Remberto
15	9:00	1:00	35.0	35.5	--	Magdalena
16	9.00	1.00	35.5	35.5	--	Remberto
17	--	--	--	--	--	--
18	--	--	--	--	--	--
19	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Remberto
20	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Magdalena
21	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Magdalena
22	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Remberto
23	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Remberto
24	--	--	--	--	--	--
25	--	--	--	--	--	--
26	9:00	12:00	35.5	36.0	Ensayo final	Magdalena
27	9:00	12:00	35.5	35.5	--	Remberto
28	9:00	12:00	35.5	36.0	--	Remberto
29	9:00	12:00	36.0	36.0	--	Remberto
30	9:00	4:00	36.0	35.5	Apagado	Remberto

	<b>REGISTRO DE CONTROL DE TEMPERATURA</b>		Página 43 de 47
			Vigente a partir de: Julio-07
Elaborado por: Lic. Amy Elieth Morán Rodríguez	Revisado por: MSc. María Evelyn S. de Ramos	Autorizado por: MSc. María Evelyn de Ramos	

**Equipo:** Incubadora      **Ubicación:** Laboratorio de aguas      **Código:** AGU-01-214-05  
**Mes:** Diciembre      **Temperatura Especificada:** 35 ± 0.5 °C

Fecha	Hora		Temperatura (°C)		Observaciones	Responsable
	a.m.	p.m.	Máxima	Mínima		
1	--	--	--	--	--	--
2	--	--	--	--	--	--
3	9:00	12:00	35.5	35.5	Encendido	Remberto
4	9:00	12:00	35.5	35.5	Ensayo final	Remberto
5	9:00	12:00	35.5	35.5		Remberto
6	9:00	4:00	35.5	35.5	--	Magdalena
7	8:00	11:00	35.5	35.5	--	Magdalena
8						
9						
10	9:00	4:00	35.5	35.5	--	Remberto
11	8:00	11:00	35.5	35.5	Apagado	Remberto
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						

	<b>REGISTRO DE TEMPERATURA Y HUMEDAD DE AREAS</b>	Página 44 de 47
		Vigente a partir de: Julio-07
Elaborado por: Lic. Amy Elieth Morán R.	Revisado por: MSc. María Evelyn de Ramos	Autorizado por: MSc. María Evelyn de Ramos

Ubicación: Flujo Laminar

Mes: Julio

Temperatura Especificada: 10 -15 °C

Fecha	Hora		Temperatura (°C)	Humedad Relativa	Responsable
	a.m.	p.m.			
1	--	--	--	--	--
2	9:00	12:00	15	62	Magdalena
3	9:00	12:00	15	62	Magdalena
4	9:00	12:00	15	61	Remberto
5	9:00	4:30	15	61	Magdalena
6	9:00	4:00	15	62	Remberto
7	--	--	--	--	--
8	--	--	--	--	--
9	9:00	12:00	15	60	Magdalena
10	9:00	12:00	15	60	Remberto
11	9:00	12:00	15	61	Remberto
12	9:00	4:00	15	60	Remberto
13	9:00	4:00	15	60	Magdalena
14	--	--	--	--	--
15	--	--	--	--	--
16	--	--	--	--	--
17	--	--	--	--	--
18	9:00	4:00	15	62	Magdalena
19	9:00	3:00	15	60	Magdalena
20	--	--	--	--	--
21	--	--	--	--	--
22	--	--	--	--	--
23	9:00	12:00	15	60	Magdalena
24	9:00	12:00	15	60	Remberto
25	9:00	4:30	15	61	Remberto
26	9:00	4:00	15	62	Magdalena
27	9:00	4:00	15	62	Magdalena
28	--	--	--	--	--
29	--	--	--	--	--
30	--	--	--	--	--
31	--	--	--	--	--

	<b>REGISTRO DE TEMPERATURA Y HUMEDAD DE AREAS</b>	Página 45 de 47
		Vigente a partir de: Julio-07
Elaborado por: Lic. Amy Elieth Morán R.	Revisado por: MSc. María Evelyn de Ramos	Autorizado por: MSc. María Evelyn de Ramos

**Ubicación:** Flujo Laminar      **Mes:** Agosto      **Temperatura Especificada:** 10 -15 °C

Fecha	Hora		Temperatura (°C)	Humedad Relativa	Responsable
	a.m.	p.m.			
1	--	--	--	--	--
2	--	--	--	--	--
3	--	--	--	--	--
4	--	--	--	--	--
5	--	--	--	--	--
6	--	--	--	--	--
7	--	--	--	--	--
8	9:00	12:00	15	61	Magdalena
9	9:00	12:00	15	61	Remberto
10	9:00	4:00	15	60	Magdalena
11	8:00	11:00	15	60	Remberto
12	--	--	--	--	--
13	9:00	12:00	15	60	Remberto
14	9:30	12:00	15	60	Magdalena
15	9:00	12:00	15	60	Magdalena
16	9:00	5:00	15	61	Remberto
17	9:00	5:00	15	60	Remberto
18	8:00	11:00	15	62	Magdalena
19	--	--	--	--	--
20	9:00	3:00	15	62	Magdalena
21	9:00	4:00	15	62	Remberto
22	--	--	--	--	--
23	--	--	--	--	--
24	9:30	2:00	15	62	Remberto
25	--	--	--	--	--
26	--	--	--	--	--
27	8:30	12:00	15	62	Magdalena
28	9:00	12:00	15	61	Magdalena
29	9:00	12:00	15	61	Magdalena
30	9:00	4:00	15	61	Remberto
31	9:00	12:00	15	61	Remberto


	<b>REGISTRO DE TEMPERATURA Y HUMEDAD DE AREAS</b>	Página 46 de 47
		Vigente a partir de: Julio-07
Elaborado por: Lic. Amy Elieth Morán R.	Revisado por: MSc. María Evelyn de Ramos	Autorizado por: MSc. María Evelyn de Ramos

Ubicación: Flujo Laminar

Mes: Noviembre

Temperatura Especificada: 10 -15 °C

Fecha	Hora		Temperatura (°C)	Humedad Relativa	Responsable
	a.m.	p.m.			
1	--	--	--	--	--
2	--	--	--	--	--
3	--	--	--	--	--
4	--	--	--	--	--
5	--	--	--	--	--
6	--	--	--	--	--
7	--	--	--	--	--
8	--	--	--	--	--
9	--	--	--	--	--
10	--	--	--	--	--
11	--	--	--	--	--
12	9:00	12:00	15	60	Remberto
13	9:00	12:00	15	60	Magdalena
14	9:00	12:00	15	61	Magdalena
15	9:00	12:00	15	60	Remberto
16	9:00	12:00	15	62	Remberto
17			--	--	--
18	--	--	--	--	--
19	9:00	12:00	15	61	Magdalena
20	9:00	12:00	15	60	Remberto
21	9:00	12:00	15	62	Remberto
22	--	--	--	--	--
23	--	--	--	--	--
24	--	--	--	--	--
25	--	--	--	--	--
26	9:00	12:00	15	60	Magdalena
27	9:00	12:00	15	61	Remberto
28	9:00	12:00	15	60	Remberto
29	9:00	12:00	15	62	Remberto
30	9:00	3:00	15	61	Remberto

	<b>REGISTRO DE CONTROL DE TEMPERATURA</b>		Página 47 de 47
			Vigente a partir de: julio-07
Elaborado por: Lic. Amy Elieth Morán Rodríguez	Revisado por: MSc. María Evelyn S. de Ramos	Autorizado por: MSc. María Evelyn de Ramos	

**Equipo:** Baño María**Ubicación:** Laboratorio de aguas**Código:** AGU-01-050-03**Mes:** Noviembre**Temperatura Especificada:** 45 ± 0.5 °C

Fecha	Hora		Temperatura (°C)	Observaciones	Responsable
	a.m.	p.m.			
1	--	--	--	--	--
2	--	--	--	--	--
3	--	--	--	--	--
4	--	--	--	--	--
5	--	--	--	--	--
6	--	--	--	--	--
7	--	--	--	--	--
8	--	--	--	--	--
9	--	--	--	--	--
10	--	--	--	--	--
11	--	--	--	--	--
12	--	--	--	--	--
13	--	--	--	--	--
14	--	2:00	45	Encendido	Remberto
15	--	2:00	46	Encendido	Magdalena
16	--	--	--	--	--
17	--	--	--	--	--
18	--	--	--	--	--
19	--	--	--	--	--
20	--	--	--	--	--
21	--	--	--	--	--
22	--	--	--	--	--
23	--	--	--	--	--
24					
25	--				
26	10:00	2:00	46	Encendido	Magdalena
27		2:00	46	Ensayo final	Remberto
28	--	2:00	45	--	Remberto
29	--	2:00	46	--	Remberto
30	10:00	2:00	46	--	Remberto



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN SALUD  
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**CENSALUD**

162 AÑOS  
AL SERVICIO DE LA  
EDUCACIÓN SUPERIOR  
SALVADOREÑA

CIUDAD UNIVERSITARIA  
FINAL 25 AVENIDA NORTE  
SAN SALVADOR, EL SALVADOR

TELEFAX NO. (503) 225-8826 Y 225-8434  
CORREO: CEN\_SALUD\_UES@HOTMAIL.COM  
RCEDILLOS@NAVEGANTE.COM.SV

## CERTIFICADO DE VALIDACIÓN

### RESUMEN DEL PROCESO DE VALIDACIÓN.

Para determinar la exactitud del método alternativo se utilizó una serie de tres concentraciones de microorganismo  $3 \times 10^3$ , 30 y  $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL; realizando tres ensayos consecutivos por un solo analista.

Para la evaluación de la repetibilidad de la precisión del método se realizaron cinco ensayos por un analista. Así como también para evaluar la reproducibilidad del método se realizaron cinco ensayos sobre tres niveles de concentración analizados por tres analistas.

La Inclusividad del método se realizó utilizando una cepa pura de *Enterobacter cloacae*; por el contrario en la exclusividad se utilizó una cepa diferente al grupo coliforme total como es la *Pseudomonas aeruginosa*.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO CENSALUD  
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

162 AÑOS  
AL SERVICIO DE LA  
EDUCACIÓN SUPERIOR  
SALVADOREÑA

CIUDAD UNIVERSITARIA  
FINAL 25 AVENIDA NORTE  
SAN SALVADOR, EL SALVADOR

TELEFAX NO. (503) 225-8826 Y 225-8434  
CORREO: CEN\_SALUD\_UES@HOTMAIL.COM  
RCEDILLOS@NAVEGANTE.COM.SV

## **CERTIFICADO DE VALIDACIÓN**

### **CONCLUSIÓN**

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método microbiológico del NMP de la técnica de fermentación en tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico, **CUMPLE CON LAS ESPECIFICACIONES ESTABLECIDAS EN EL PROTOCOLO DE VALIDACIÓN.** Por esta razón se da por **VALIDADO.**

\_\_\_\_\_  
MSc. Maria Evelyn de Ramos  
Jefe de Control de Calidad  
Microbiológico  
CENSALUD-UES

\_\_\_\_\_  
Lic. René Francisco Ramos  
Asesor de Validación

Equipo de Validación:

- Br. Magdalena Guadalupe Hernández Acosta      F. \_\_\_\_\_
- Br. José Remberto Cabrera Aguilar                F. \_\_\_\_\_

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR.  
MAYO 2008.

CAPITULO VII  
CONCLUSIONES

## 7.0 CONCLUSIONES

1. La validación de un método microbiológico cuenta con los mismos principios que la validación de un método químico o instrumental; lo que cambia es la interpretación de las respectivas variables que se evalúan por el hecho de trabajar con microorganismos vivos. En el campo de microbiología, el uso de correctos controles de calidad es de particular importancia para asegurar los resultados obtenidos.
2. Se determinó como rangos de concentración de trabajo de  $3 \times 10^3$  a  $3 \times 10^{-1}$  UFC/mL, donde la producción de fluorescencia debido a la hidrolización del fluorogéno por la enzima  $\beta$ -D-Glucoronidasa es detectada por el método.
3. Los datos indican que el método alternativo es comparable al método convencional para la detección de coliformes totales, fecales y *E. coli* en análisis rutinarios de aguas. La habilidad del método alternativo para detectar *Escherichia coli* requiere de menor tiempo de análisis y reducción en la cantidad de medios. Los estudios realizados con interferencia bacteriana establecen que los ensayos fluorogénicos son más avanzados que el método convencional.
4. En la precisión del método del número más probables para la determinación de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*, existen factores que pueden incidir en los resultados como son los analistas, la calidad de la cepa

y su mantenimiento. Donde los resultados obtenidos en el estudio se encuentran conformes según las guías de la AOAC Internacional para validación de métodos microbiológicos cualitativos y cuantitativos.

5. De acuerdo a los estudios realizados por comparación entre el método microbiológico alternativo del NMP y el respectivo de referencia, al aplicar una prueba de t Student se obtuvieron resultados suficientemente exactos, determinando que el valor hallado y el valor considerado como verdadero no difieren significativamente; según las especificaciones establecidas por la AOAC Internacional para la validación de métodos microbiológicos cualitativos y cuantitativos; y las recomendaciones de la norma ISO 16140, de manera que se comprobó que el procedimiento funciona confiablemente; ya que modificaciones pequeñas deben afectar poco o nada el resultado final del análisis.
6. Los resultados del CV % promedio en la Repetibilidad del método para los tres niveles de concentración se encuentra dentro del criterio de aceptación, por lo que el método cumple con el parámetro de repetibilidad de la precisión del método.
7. Para la reproducibilidad del método microbiológico evaluado a una concentración alta, no se observaron cambios significativos en la variabilidad entre los ensayos de los analistas, manteniéndose dentro del criterio de aceptación ; tampoco se observaron diferencias en la variación de los ensayos realizados por estos analistas en niveles de concentración medio y

bajo. El método se encuentra conforme para el criterio de variación en los tres niveles de concentración en los que se evaluó, por lo que se considera que cumple con la reproducibilidad de la precisión del método.

8. Los resultados falsos negativos para *Escherichia coli* del método alternativo no influyen en los resultados obtenidos ya que la bacteria puede ser detectada por la fluorescencia aunque la producción de gas se encuentre suprimida en alguno de los tubos de prueba.
9. El método microbiológico alternativo provee niveles de detección de coliformes y *E. Coli* mayores (99%) comparables con los niveles de detección del método de referencia (97%). Como resultado de ensayos realizados con precisión y exactitud determinada.
10. De acuerdo a los resultados obtenidos durante todo el proceso de validación, se concluye que el método del número más probable por la técnica de fermentación en tubos múltiples utilizando el medio fluorogénico como herramienta de análisis para el análisis microbiológicos de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli* en aguas posee precisión, exactitud, Inclusividad y exclusividad. Por la tanto se confirma que el método cumple con los requerimientos particulares para su uso y se da como validado.

CAPITULO VIII  
RECOMENDACIONES

## 8.0 RECOMENDACIONES

1. Que los analistas que realicen el método alternativo del número más probable deben ser personas capacitadas en el manejo y análisis de muestras de agua, para minimizar las variaciones que puedan afectar los resultados.
2. Tomar en cuenta que al realizar las diluciones de las concentraciones del inóculo de microorganismo, se debe utilizar material debidamente esterilizado y exclusivo para cada dilución, evitando la contaminación cruzada entre una dilución y otra, además de una homogénea distribución de la suspensión de bacteria al momento de realizar cada uno de los niveles de inóculo y posterior inoculación de los tubos al medio de cultivo, para la obtención de resultados satisfactorios.
3. Se debe tener una especial precaución en la manipulación de cepas bacterianas que son potencialmente patógenas reduciendo al mínimo los niveles de contaminación para el analista (s), material, equipo y medio ambiente de igual forma tratar los desechos de forma adecuada con la respectiva esterilización y destrucción de cultivos bacterianos.

4. Emplear el medio fluorogénico como una alternativa atractiva para la detección de coliformes en aguas, para realizar los ensayos con mayor rapidez, menos costos y proporciona mayor confianza por el hecho que falsos negativos pueden ser detectados en comparación con el método de referencia.
  
5. Tomar en cuenta que al trabajar con diferentes tipos y fuentes de origen de aguas es necesario someter el método a un proceso de validación tomando en cuenta las características propias, distintivas y del origen que proviene el agua que se desea analizar. Siguiendo las recomendaciones de la AOAC para métodos microbiológicos.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- AOAC INTERNATIONAL. 1999. AOAC International Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation. Journal of AOAC International. V. 82, N° 2. p. 1 (13): 402 - 415.
- 2- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Waters Work Association), WPCF (Water Pollution Control Federation). 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ediciones Díaz de Santos S.A. 17 ed. Madrid, España. 9 - (79 - 95) p.
- 3- Baena, G. 1982. Instrumentos de Investigación. Editores Mexicanos Unidos, S.A. 9 ed. México DF, MX.
- 4- Castro, G. y otros. 1998. Validación de Métodos Analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. 1 ed. España. p. 4 - 55.
- 5- CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), MSPAS (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social), COSUDE (Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación).1999. Norma Salvadoreña para la calidad del agua potable. San Salvador, ESA. p. 8, 9, 17, 18, 20, 21, 27 - 29.
- 6- Contreras, R. y otros. 2004. Evaluación Microbiológica de la Calidad del Agua Potable que distribuye ANDA en los sectores de San Bartolo, Santa Lucía y San Martín. Trabajo de Graduación. Facultad de Química y Farmacia. San Salvador. Universidad de El Salvador. 89 p.

- 7- Cuesta, I. A. 2006. Validación de Métodos Microbiológicos. Protocolo de validación (en línea). Consultaría Internacional de la FAO. Consultado 7 mayo. 2007. Disponible en:  
<http://www.rlc.fao.org/prior/comagric/codex/rla3013/pdf/aseg10.pdf>.
- 8- Dogan, H.B y otros. 2002. Comparison of LST-MUG broth technique and conventional method for the enumeration of *Escherichia coli* in food. Applied Microbiology. V. 34. p. 1 (4): 274 - 278.
- 9- Elmer, W. y otros. 2003. Diagnóstico Microbiológico. 2 ed. Buenos Aires. Argentina. p. 197.
- 10-Feldsine, P. y otros. 2000. AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Method of Analysis. Journal of AOAC INTERNATIONAL. V. 85, Nº 5. p. 1 (13): 1187 - 1200.
- 11-Food and Consumer Product Safety Authority. 2006. ISO 16140. Validación de Métodos Alternativos. CEN - JRC workshop, Bruselas, consultado en:  
[www.cen.eu/cenorm/businessdomains/businessdomains/food/intveld.pdf](http://www.cen.eu/cenorm/businessdomains/businessdomains/food/intveld.pdf).
- 12-Hartman, P. y otros. 1982. Fluorogenic assay for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. V. 43, Nº 6. P. 1 (9): 1320 - 1329.

- 13-Kenneth J. y otros. 2005. *Sherris Microbiología Médica*. 4 ed. McGraw Hill Interamericana Editores S.A. de CV. México DF. MX. p. 382, 383, 1001 - 1003.
- 14-Manafi, M. 2000. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *Journal of Food Microbiology*. V. 60. p. 1(13): 205 - 218.
- 15-Muñoz, S. 2006. Validación del Método Microbiológico Cilindro-Placa para la Potencia del Antibiótico Lincomicina Clorhidrato. Trabajo de Graduación. Facultad de Química y Farmacia. San Salvador. Universidad de El Salvador. 82 p.
- 16- Murray S. 1982. *Estadística*. 1 ed. McGraw Hill Interamericana Editores S.A. de CV. México DF. MX. p. 188, 344.
- 17-Prescott, L. y otros. 1993. *Microbiología*. 2 ed. WCB Publishers. Iowa. EUA. p. 838, 839.
- 18-Reyes, R. 2006. Seminario (1, 2006, Antiguo Cuscatlán. ESA) 2006. Validación de Métodos Microbiológicos. Antiguo Cuscatlán. ESA. Presentación para Laboratorios Teramed. Presentaciones I. II y III.
- 19-Trepeta R. y otros.1984. Methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 19(2):172 - 174.
- 20-United States Pharmacopeial Convention, inc. 2006. *Farmacopea de los Estados Unidos de América*. 29 ed. Formulario Nacional (NF). 24 ed. Washington D.C. EUA. Apartado <1225>, p. 3895 - 3898.

21-Venkateswaran, K. y otros.1996. Comparison of Commercially available Kits with Standard Methods for the Detection of Coliforms and ***Escherichia coli*** in food. Applied and Environmental Microbiology. V. 62, N° 7. p. 1 (7): 2236 - 2243.

22-ICH (International Conference on Harmonisation. Noviembre1996. Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B. ICH Harmonised Tripartite Guideline. EU, Japan and USA. 8 p.

## GLOSARIO

**Aerobio:** que crece o metaboliza en presencia de oxígeno libre. <sup>(9)</sup>

**Agar:** un polisacárido (galactan) extraído de Gelidium y otras algas marinas utilizado como agente solidificante en medio de cultivo. <sup>(9)</sup>

**Agente antimicrobiano:** agente que mata los microorganismos o puede inhibir su crecimiento. <sup>(13)</sup>

**Agua natural:** agua de manantial, mineral, artesiana o de pozo la cual se deriva de una formación subterránea y que no proviene de un sistema de abastecimiento municipal o público de agua. <sup>(2)</sup>

**Agua purificada:** es la producida por destilación, desionización, ósmosis en reverso, u otro proceso adecuado que satisfaga la definición de agua purificada de la edición más reciente de la USP (farmacopea de los EE.UU.). Sólo el agua que satisfaga esta definición, y que sea vaporizada y luego condensada, puede ser etiquetada o rotulada «agua destilada». <sup>(2)</sup>

**Anaerobio:** que tiene la capacidad de vivir o metabolizar en ausencia de oxígeno. <sup>(9)</sup>

**Anaerobio facultativo:** que suele vivir en presencia de oxígeno, pero puede sobrevivir en ausencia de él. <sup>(13)</sup>

**Analito:** componente medible por el método de análisis. En el caso de métodos microbiológicos, este es el microorganismo o productos por asociación (ej. enzimas o toxinas). <sup>(10)</sup>

**Antígeno:** sustancia que induce a una respuesta inmunitaria específica o que reacciona con un anticuerpo *in vitro*. (17)

**Análisis de varianza:** para determinar si el método alternativo no es estadísticamente diferente al método de referencia una vía es el análisis de varianza o una prueba-t para cada tipo de alimento o nivel de inoculación. (10)

**Catalasa:** enzima que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno tóxico a oxígeno y agua. (17)

**Cepa:** Un cultivo o aislado microbiano. (17)

**Cromógeno:** un sustrato coloreado que es activado por una enzima que produce una coloración final. (17)

**Cultivo:** cualquier crecimiento de microorganismos microscópicos. (9)

**Colonia:** una agrupación de microorganismos que crece sobre una superficie sólida de un agar medio de cultivo; el agrupamiento se puede observar a simple vista, pero muchas pueden verse solo microscópicamente. (9)

**Dilución:** es el efecto de disminuir la concentración de soluto presente en una solución, aumentando la cantidad de disolvente. (10)

**Enterobacterias:** son pequeños bacilos gramnegativos que poseen flagelos peritricos móviles. Se trata de organismos quimiorganotróficos y su metabolismo es de ambos tipos fermentativo y respiratorio. Casi todos los representantes son catalasa positivo y oxidasa negativos, la mayor parte de cepas reduce los nitratos o nitritos. (17)

***Escherichia coli***: son bacilos Gramnegativos, no formadores esporas que fermentan la lactosa con producción de gas. Cuando se utiliza un medio MUG, la ***Escherichia coli*** se define como la bacteria coliforme que posee la enzima  $\alpha$ -D-glucoronidasa que hidroliza al sustrato fluorogénico con MUG con producción de fluorescencia. <sup>(9)</sup>

**Estéril**: libre de todo organismo vivo. <sup>(9)</sup>

**Estudio prelaborativo o métodos de comparación**: estudio desarrollado por la organización de un laboratorio acerca de un método alternativo con respecto a un método de referencia. <sup>(10)</sup>

**Estudios interlaboratorios o colaborativos**: estudio desarrollado por diferentes laboratorios bajo el control de la organización del laboratorio. <sup>(10)</sup>

**Fermentación**: oxidación aeróbica-anaeróbica de compuestos por la acción enzimática de los microorganismos. <sup>(17)</sup>

**Fluorogéno**: un sustrato que produce como resultado de la activación por una enzima específica una fluorescencia final. <sup>(17)</sup>

**Grupo coliforme total**: bacterias coliformes de bacilos cortos gram-negativos que fermentan lactosa y forman ácido y gas son anaerobios facultativos y se multiplican con mayor rapidez a temperaturas de 30 a 37°C. <sup>(9)</sup>

**Grupo coliforme fecal**: son aquellos microorganismos que crecen y producen gas a partir de la lactosa en un medio que contiene sales biliares u otros agentes selectivos equivalentes, incubados a temperaturas de 44 a 45,5°C. <sup>(9)</sup>

**Laboratorio acreditado:** es el laboratorio que asegura resultados contables de acuerdo al laboratorio de referencia nacional. <sup>(10)</sup>

**Medio diferencial:** medio de cultivo que distingue entre grupos de microorganismos basado en diferencias en sus características biológicas. <sup>(17)</sup>

**Medio selectivo:** medio de cultivo sólido - líquido que contiene sustancias químicas específicas que permite el desarrollo de un grupo de organismos específicos, inhibiendo al mismo tiempo el desarrollo de otros. <sup>(17)</sup>

**Método alternativo:** método de análisis que demuestra o estima, para una categoría dada de productos, donde el analito puede ser medido de igual forma como en el método de referencia. El método puede ser propietario o no comercial y no necesita cubrir por completo el procedimiento de análisis, que es, de la preparación de la muestra a los resultados de la prueba. <sup>(10)</sup>

**Método de referencia:** método de referencia aprobado por organismos internacionales en los cuales describe procedimientos que son aplicables al analito y tipos de muestras que el método alternativo esta interesado en detectar. <sup>(10)</sup>

**Muestra:** la que se tome en el punto de descarga, de manera continua, en día normal de operación que refleje cuantitativa y cualitativamente el o los procesos más representativos de las actividades que generan la descarga, durante el tiempo necesario para completar cuando menos, un volumen suficiente para que se lleven a cabo los análisis necesarios para conocer su composición, aforando el caudal descargado en el sitio y en el momento de muestreo. <sup>(2)</sup>

**Número más probable (NMP):** expresión estadística que se utiliza para estimar la cantidad de bacterias coliformes presentes en un volumen de muestra determinado. (17)

**Organismos coliformes fecales (termotolerantes):** comprende todos los bacilos aerobios o anaerobios facultativos, gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a  $(44.0 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$  en un plazo de 24 horas. (17)

**Parámetro:** aquella característica que puede ser sometida a medición. (7)

**Turbidez:** es la medida de la transparencia de una muestra de agua debido a la presencia de partículas en suspensión, expresada en NTU. (17)

**Valor recomendado:** corresponde a la concentración de sustancias o densidad de bacterias donde no hay riesgo sobre la salud de los consumidores. (2)

**Valor máximo admisible:** corresponde a la concentración sustancias o bacterias a partir de la cual provoca rechazo por parte de los consumidores o donde existe un riesgo para la salud. A superación de estos valores implica la toma de acciones correctivas inmediatas. (2)

**Unidades formadoras de colonias (UFC):** el numero de microorganismos que pueden formar colonias en siembra por placa estriada o placa vertida, e indica el numero de microorganismos viables en una muestra. (17)

ANEXOS

## ANEXO 1

Tabla N° 19: Índice de NMP y límites de aceptación del 95 por 100 para distintas combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se emplean diez porciones de 10 ml. <sup>(2)</sup>

Número de tubos con reacción positiva de un total de diez de 10 mL cada uno.	Índice NMP/ 100 mL	Límites de confianza del 95% (aproximados)	
		Superior	Inferior
0	< 1.1	0	3.0
1	1.2	0.03	5.9
2	2.2	0.26	8.1
3	3.6	0.69	10.6
4	5.1	1.3	13.4
5	6.9	2.1	16.8
6	9.2	3.1	21.1
7	12.0	4.3	27.1
8	16.1	5.9	36.8
9	23.0	8.1	59.5
10	>23.0	13.5	Infinito

## ANEXO 2

### Escala de McFarland

#### Materiales:

10 tubos rosca de 16\* 150 mm

Solución de Cloruro de bario al 1% (1.75% p/v)

Solución de Ácido Sulfúrico al 1%

#### Procedimiento:

Medir y servir en cada tubo los volúmenes que aparezcan en la siguiente tabla.

Tabla Nº 20: Preparación de escala McFarland

<b>Tubo</b>	<b>BaCl<sub>2</sub> (mL)</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>[ ] Bacteriana*10<sup>8</sup></b>
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

### ANEXO 3

Tabla N° 21: Preparación del medio líquido lauril triptosa. (2)

Inóculo mL	Cantidad de medio en el tubo (mL)	Volumen del medio + inóculo (mL)	Medio líquido de LST deshidratado necesario (g/L)
1	10 o más	11 o más	35.6
10	10	20	71.2
10	20	30	53.4
100	50	150	106.8
100	35	135	137.1
100	20	120	213.6

## ANEXO 4

Cuadro N° 6: Valores máximos admisibles para la calidad microbiológica del agua potable según la norma salvadoreña obligatoria NSO 13.07.01:97. <sup>(3)</sup>

PARAMETRO	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE		
	TÉCNICA		
	FILTRACIÓN POR MEMBRANA	TUBOS MULTIPLES	PLACA VERTIDA
Bacterias coliformes totales	0 UFC/100 mL	<1.1 NMP /100 mL	
Bacterias coliformes fecales	0 UFC /100 mL	Negativo	
<b><i>Escherichia coli</i></b>	0 UFC/ 100 mL	Negativo	
Conteo de Bacterias heterótrofas	50 UFC/ mL max	-	100 UFC/ mL
Organismos patógenos	Ausencia		

## ANEXO 5

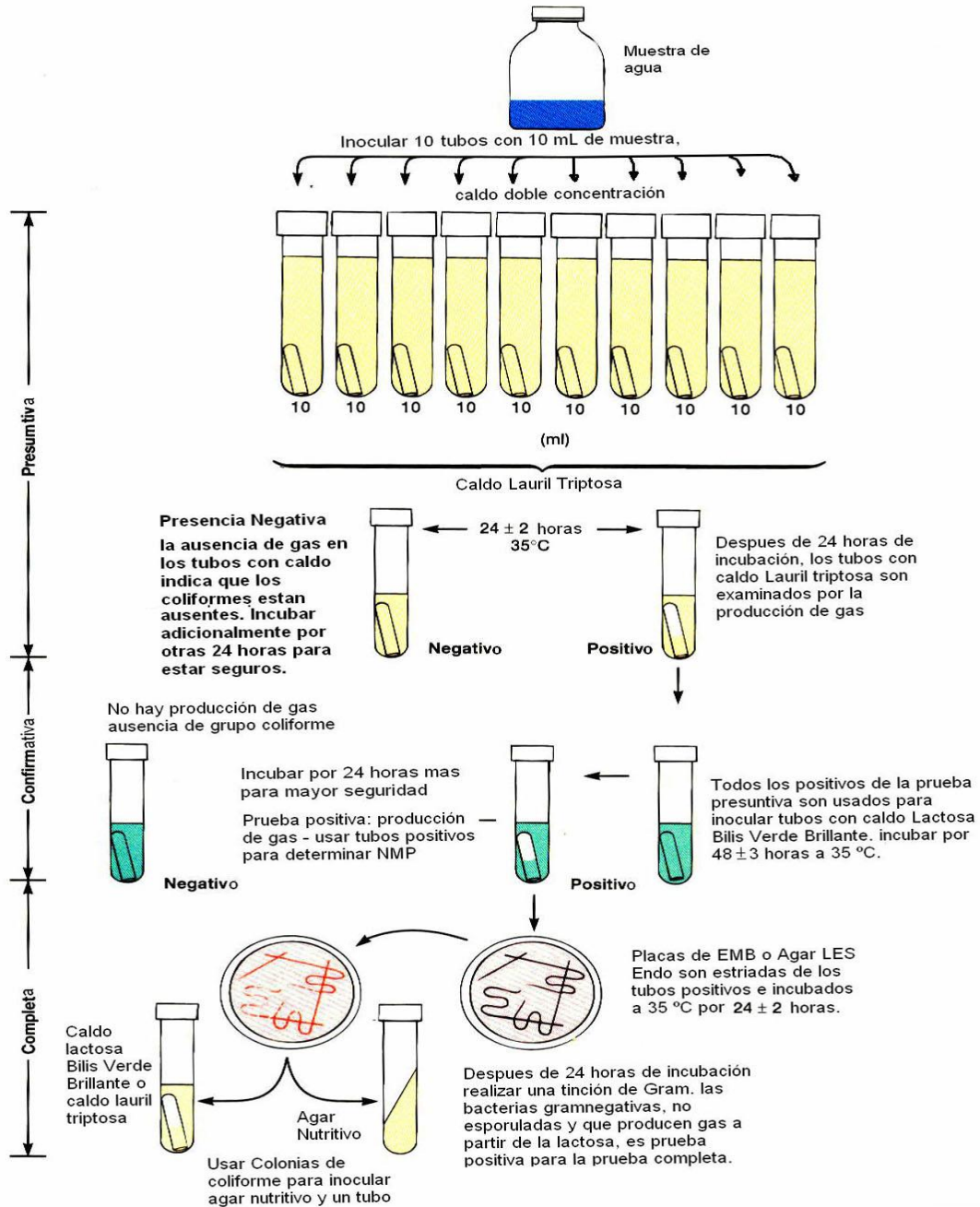


Figura N° 1: Esquema de la prueba completa para la detección de coliformes totales. (16)

## ANEXO 6

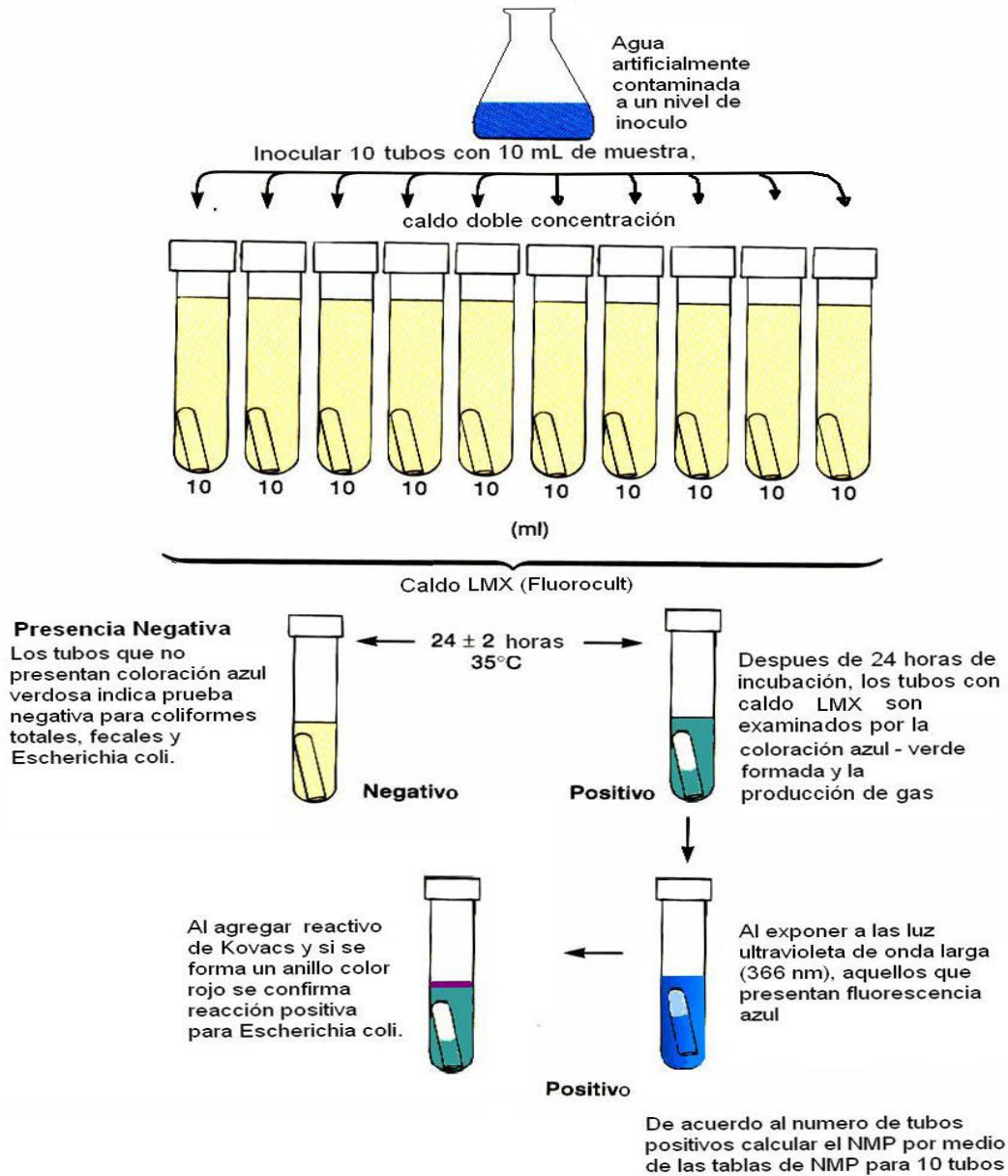


Figura N° 2. Esquema de la prueba de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli* utilizando un medio fluorogénico (caldo LMX). (16)

## ANEXO 7

Tabla N° 22: Resultados del ensayo para reproducibilidad del método fluorogénico realizado por el analista 1.

<b>[ ] Inóculo UFC/mL</b>	<b>Repetición 1 N° de tubos positivos</b>	<b>Repetición 2 N° de tubos positivos</b>	<b>Repetición 3 N° de tubos positivos</b>	<b>Repetición 4 N° de tubos positivos</b>	<b>Repetición 5 N° de tubos positivos</b>
3x10 <sup>3</sup>	10	10	10	10	9
30	10	10	10	9	10
3x10 <sup>-1</sup>	9	10	10	10	9

Tabla N° 23: Resultados del ensayo para reproducibilidad del método fluorogénico realizado por el analista 2.

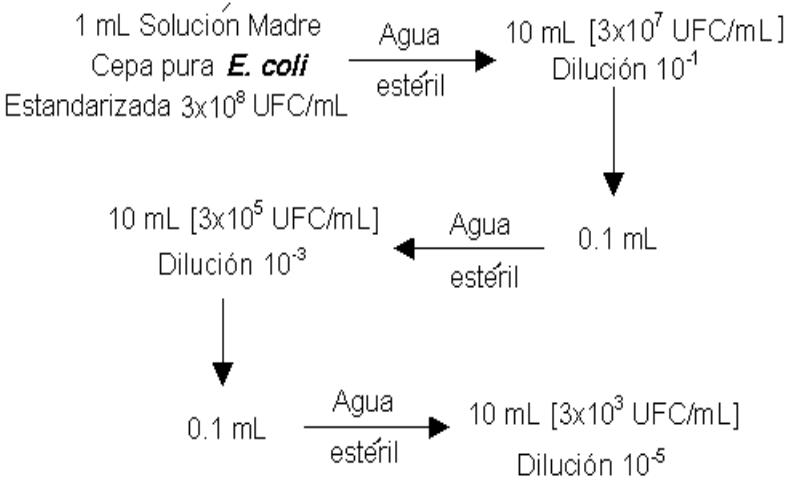
<b>[ ] Inóculo UFC/mL</b>	<b>Repetición 1 N° de tubos positivos</b>	<b>Repetición 2 N° de tubos positivos</b>	<b>Repetición 3 N° de tubos positivos</b>	<b>Repetición 4 N° de tubos positivos</b>	<b>Repetición 5 N° de tubos positivos</b>
3x10 <sup>3</sup>	10	10	10	10	10
30	9	10	10	10	10
3x10 <sup>-1</sup>	9	10	10	10	9

Tabla N° 24: Resultados del ensayo para reproducibilidad del método fluorogénico realizado por el analista 3.

<b>[ ] Inóculo UFC/mL</b>	<b>Repetición 1 N° de tubos positivos</b>	<b>Repetición 2 N° de tubos positivos</b>	<b>Repetición 3 N° de tubos positivos</b>	<b>Repetición 4 N° de tubos positivos</b>	<b>Repetición 5 N° de tubos positivos</b>
3x10 <sup>3</sup>	10	9	10	10	10
30	9	10	10	10	10
3x10 <sup>-1</sup>	10	10	10	10	9

## ANEXO 8

Cuadro N° 7: Hoja de trabajo para realizar diluciones del inoculo para llevarlo a un nivel de concentración determinado.

<b>Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico. CENSALUD Universidad de El Salvador</b>	Validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico. Cálculos de la Precisión
<p>Fecha de análisis: <u>29 - Noviembre - 2007</u></p> <p>Concentración de Bacterias: <u><math>3 \times 10^3</math> UFC/mL</u></p> <p>Diluciones de la Muestra:</p>  <p>El diagrama muestra el proceso de dilución de una solución madre de <i>E. coli</i>. Comienza con 1 mL de solución madre estandarizada a <math>3 \times 10^8</math> UFC/mL. Se realiza una dilución de <math>10^{-1}</math> añadiendo 9 mL de agua estéril para obtener 10 mL a <math>3 \times 10^7</math> UFC/mL. De esta solución, se toman 0.1 mL y se añaden a 9.9 mL de agua estéril para obtener 10 mL a <math>3 \times 10^5</math> UFC/mL (dilución <math>10^{-3}</math>). Finalmente, se toman 0.1 mL de esta solución y se añaden a 9.9 mL de agua estéril para obtener 10 mL a <math>3 \times 10^3</math> UFC/mL (dilución <math>10^{-5}</math>).</p>	

## ANEXO 9

Cuadro N° 8: Ejemplo de hoja de cálculos para determinar precisión, utilizando valor de media y desviaciones estándar calculadas usando el programa estadístico SPSS v. 14.0.

<b>Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico. CENSALUD Universidad de El Salvador</b>	<b>Validación de la prueba de coliformes totales y fecales por la técnica de tubos múltiples utilizando un medio fluorogénico. Cálculos de la Precisión</b>		
<p>Fecha de análisis: <u>29 - Noviembre - 2007</u>                  Fecha de tabulación y realización de cálculos: <u>12 de diciembre 2007</u>                  Concentración de Bacterias: <u>3x10<sup>3</sup> UFC/mL</u></p> <p>Tabular en programa estadístico los valores de NMP transformados a logaritmo base 10</p>			
<b>N° de repetición</b>	<b>N° de tubos positivos</b>	<b>Valor de NMP/100 mL</b>	<b>Log base 10 NMP/100 mL y</b>
1	10	23.01	1.3619
2	10	23.01	1.3619
3	10	23.01	1.3619
4	10	23.01	1.3619
5	10	23.00	1.3617
Valor de media y desviación estándar calculados usando el programa estadístico SPSS.			
<b>[ ] de inculo UFC/mL</b>	<b>n</b>	$\bar{y}$	<b>S<sub>r</sub></b>
3x10 <sup>3</sup>	5	1.361860	0.0000894
Calcular el CV % utilizando los valores de media y S <sub>r</sub> obtenidos del programa:			
$CV_r(\%) = \frac{S_r}{\bar{y}} * 100$			
$CV_r(\%) = (0.0000894/1.361860) \times 100$			
$CV_r(\%) = (0.0000066) \times 100$			
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px 5px;"> <b>CV<sub>r</sub> (%) = 0.0066</b> </div>			

## ANEXO 10

Cuadro N° 9: Hoja de resultados de la prueba t Student para evaluar exactitud calculado utilizando el programa estadístico SPSS v. 14.0 eng. for Windows.

Notes		
<b>Output Created</b>	12-DIC-2007 11:17:44	
<b>Comments</b>		
<b>Input</b>	<b>Data</b>	C:\WINDOWS\Escritorio\verdadera exactitud.sav
	<b>Filter</b>	<none>
	<b>Weight</b>	<none>
	<b>Split File</b>	<none>
	<b>N of Rows in Working Data File</b>	9
<b>Missing Value Handling</b>	<b>Definition of Missing</b>	User defined missing values are treated as missing.
	<b>Cases Used</b>	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
<b>Syntax</b>		T-TEST PAIRS = Fluorocult WITH LST (PAIRED) /CRITERIA = CI (.95) /MISSING = ANALYSIS.
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	0:00:00.00

[DataSet1] C:\WINDOWS\Escritorio\exactitud.sav

Paired Samples Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
<b>Pair 1</b>	<b>Método Alternativo</b>	1.361878	9	.0000667	.0000222
	<b>Método Referencia</b>	1.361856	9	.0000882	.0000294

Paired Samples Test									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
<b>Pair 1</b>	<b>Método Alternativo - Método Referencia</b>	.0000222	.0000667	.0000222	-.0000290	.0000735	1.000	8	.347

## ANEXO 11

Cuadro N° 10: Ejemplo de hoja de resultados de la prueba t Student para reproducibilidad proporcionado por el programa estadístico SPSS v. 14.

One-Sample Statistics				
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
<b>concentración media Analista 3</b>	5	1.361860	.0000894	.0000400

One-Sample Statistics				
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
<b>concentración alta Analista 2</b>	5	1.361900	.0000000	.0000000

One-Sample Statistics				
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
<b>concentración baja Analista 1</b>	5	1.361820	.0001095	.0000490

Syntax MEAN

/VAL = 0

/MISSING = ANALYSIS

/VARIABLES = Fluorocult

/CRITERIA = CI(.95) .

## ANEXO 12

Tabla N° 25: Puntos porcentuales de la distribución t. (16)

II. Puntos porcentuales\* de la distribución t.

$\alpha$	.40	.25	.10	.05	.025	.01	.005	.0025	.001	.0005
1	.325	1.000	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	127.32	318.31	636.62
2	.289	.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.089	23.326	31.598
3	.277	.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.213	12.924
4	.271	.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	.257	.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	.255	.727	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	.253	.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.019	4.785	5.408
8	.252	.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	.251	.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	.250	.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	.250	.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	.259	.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	.259	.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	.258	.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	.258	.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	.258	.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	.257	.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	.257	.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	.257	.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	.257	.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	.257	.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	.256	.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	.256	.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.767
24	.256	.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	.256	.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	.256	.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	.256	.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	.256	.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	.256	.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	.256	.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	.255	.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
60	.254	.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
120	.254	.677	1.289	1.658	1.990	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
$\infty$	.253	.674	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

$\nu$  = grados de libertad.

\*Adaptado, con permiso, de *Biometrika Tables for Statisticians*, Vol. 1, 3a ed., por F. S. Pearson y H. O. Hartley, Cambridge University Press, Cambridge, 1966.

## ANEXO 13

Certificados de calibración de equipos realizados por el Laboratorio de Metrología Legal del CONACYT.

**Laboratorio Nacional de Metrología Legal**  
*Certificado de Caracterización*

Registro:   
RT-009/07

Se refiere a:

Objeto de la Calibración: INCUBADORA

Marca: SELECTA

Numero Activo fijo: 12050-0204-462-0010

Número de inventario: AGU-01-214-05

Número de serie: 0412396

Fecha de la medición: 07/11/23

Está constituido de: 3 páginas.

Destinatario: CENSALUD.  
Ciudad Universitaria, Final 25 Avenida Norte, San  
Salvador, El Salvador, Centro América

Solicitado por: CENSALUD.

Fecha: 07/11/23



  
Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe

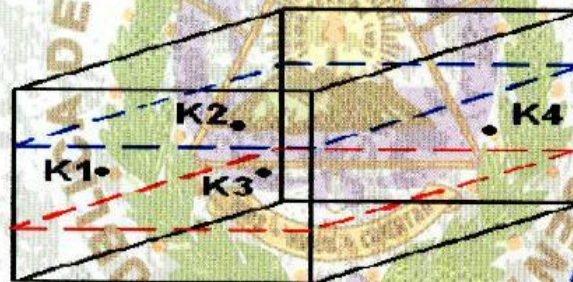
**Laboratorio Nacional de Metrología Legal**  
*Certificado de Caracterización*

El Laboratorio Nacional de Metrología Legal de El Salvador hace constar, que a solicitud de la **CENSALUD**, se Caracterizó una incubadora, la cual posee las características siguientes:

Marca: SELECTA  
 N° DE ACTIVO: 12050-0204-462-0010  
 N° de Inventario: AGU-01-214-05

La incubadora fue caracterizada introduciendo cuatro termocuplas flexibles tipo K (COLE PARMER) en la recámara según detalle, las cuales fueron conectadas a un Multimetro digital marca KEITHLEY modelo 2000.

Los resultados obtenidos fueron:



TEMPERATURA DE PRUEBA	TEMPERATURA DEL INDICADOR	K1(°C)	K2(°C)	K3(°C)	K4(°C)	TEMPERATURA (°C)
35.0°C	35.0°C	36.16	36.10	36.64	36.27	36.29

## Laboratorio Nacional de Metrología Legal

### *Certificado de Caracterización*

La incertidumbre expandida de las temperaturas es de  $\pm 0.07$  °C, la cual fue calculada para un intervalo de confianza de aproximadamente el 95%.

La cadena de trazabilidad está garantizada por el patrón de trabajo con certificado N° TC-005/07 de Noviembre/2007 del LABORATORIO NACIONAL DE METROLOGÍA LEGAL (EL SALVADOR), trazadas al patrón de referencia con certificado N° CNM-CC-420-224/2005 del CENTRO NACIONAL DE METROLOGIA (CENAM), de MEXICO.

El presente certificado solo ampara las mediciones reportadas en el momento y condiciones en que se realizó la caracterización.

San Salvador, 23 de Noviembre del 2007.

  
Jorge A. Medrano  
Metrólogo



  
Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe

**Laboratorio Nacional de Metrología Legal**  
*Certificado de Caracterización*

Registro:   
RT-010/07

Se refiere a:

Objeto de la Calibración: BAÑO DE AGUA

Marca: RAYPA

Numero Activo fijo: 12050-0204-113-0026

Número de inventario: AGU-01-050-03

Número de serie: S/N

Fecha de la medición: 07/11/23

Está constituido de: 3 páginas.

Destinatario: CENSALUD.  
Ciudad Universitaria, Final 25 Avenida Norte, San  
Salvador, El Salvador, Centro América

Solicitado por: CENSALUD.

.Fecha: 07/11/23



  
Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe

## Laboratorio Nacional de Metrología Legal

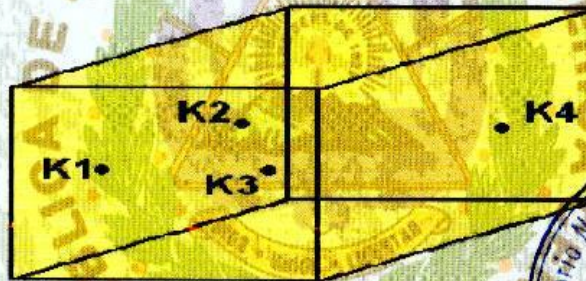
### *Certificado de Caracterización*

El Laboratorio Nacional de Metrología Legal de El Salvador hace constar, que a solicitud de la **CENSALUD**, se Caracterizó un baño de agua, la cual posee las características siguientes:

Marca: RAYPA  
 Nº DE ACTIVO: 12050-0204-113-0026  
 Nº de Inventario: AGU-01-050-03

El baño fue caracterizado introduciendo cuatro termocuplas flexibles tipo K (COLE PARMER) en la recamara según detalle, las cuales fueron conectadas a un Multiméetro digital marca KEITHLEY modelo 2000.

Los resultados obtenidos fueron:



TEMPERATURA DE PRUEBA	TEMPERATURA DEL INDICADOR	K1(°C)	K2(°C)	K3(°C)	K4(°C)	TEMPERATURA PROMEDIO(°C)
45.0°C	45.0°C	46.87	46.70	47.15	47.20	46.98



## Laboratorio Nacional de Metrología Legal

### *Certificado de Caracterización*

La incertidumbre expandida de las temperaturas es de  $\pm 0,07$  °C, la cual fue calculada para un intervalo de confianza de aproximadamente el 95%.

La cadena de trazabilidad está garantizada por el patrón de trabajo con certificado N° TC-005/07 de Noviembre/2007 del LABORATORIO NACIONAL DE METROLOGÍA LEGAL (EL SALVADOR), trazadas al patrón de referencia con certificado N° CNM-CC-420-224/2005 del CENTRO NACIONAL DE METROLOGIA (CENAM), de MEXICO.

El presente certificado solo ampara las mediciones reportadas en el momento y condiciones en que se realizó la caracterización.

San Salvador, 23 de Noviembre del 2007

Jorge A. Medrano  
Metrólogo

Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe



**Laboratorio Nacional de Metrología Legal**  
*Certificado de Calibración*

Registro:   
CB-103/07

Se refiere a:

Objeto de la Calibración: Balanza Electrónica

Marca: SARTORIUS

Modelo: BL 600

Número de Serie: 13603713

Número de Inventario: 12050 - 0204 - 106.0035

Número de Identificación: PRE - 02 - 038 - 01

Fecha de la medición: 07/11/23

Está constituido de: 4 páginas

Destinatario: CEN - SALUD, UES.  
Ciudad Universitaria, Final 25 Avenida Norte, San Salvador El Salvador, C. A.

Solicitado por: CEN - SALUD, UES.

Fecha: 07/11/23



  
Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe

1/3



**Laboratorio Nacional de Metrología Legal**  
*Certificado de Calibración*

El Laboratorio Nacional de Metrología Legal CERTIFICA: que a solicitud de **CEN – SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**, se calibró la balanza siguiente:

Marca: SARTORIUS  
 Modelo: BL 600  
 N° de Identificación: PRE – 02 – 038 – 01  
 N° de Inventario: 12050 – 0204 – 106.0035  
 N° de Serie: 13603713  
 Máxima capacidad: 600 g  
 Mínima división: 0,1 g

La balanza fue calibrada en su lugar de trabajo y procediendo con base en la recomendación internacional R 76-1 de la Organización Internacional de Metrología Legal OIML, se obtuvieron los resultados siguientes:

**Prueba de Excentricidad:** Consiste en determinar los errores que se cometen cuando no se coloca la carga en el centro del plato de la balanza.

Carga de prueba **200,0 g**. Diferencia máxima de Excentricidad: **0,2 g**

**Prueba de Linealidad o Exactitud:** Consiste en determinar los errores de la balanza en todo su rango de trabajo.

CARGA NOMINAL (g)	CORRECCIÓN (g)	INCERTIDUMBRE (± g) K=2
0	0.0	0.0
60	0.0	0.1
120	0.0	0.1
180	0.0	0.1
240	0.0	0.1
300	0.0	0.1
360	0.0	0.1
420	0.0	0.1
480	0.0	0.1
540	0.0	0.1
600	0.0	0.1





## Laboratorio Nacional de Metrología Legal

### *Certificado de Calibración*

La calibración fue realizada a una temperatura de  $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$  y a una humedad relativa promedio del 46%.

Los resultados fueron obtenidos utilizando el juego de patrones de masa F1 con número de inventario 32.001.

La cadena de trazabilidad está garantizada por los patrones trabajo con certificado N° CM-026/07 de Enero/07 del LNML, trazados a los patrones de referencia con certificados N° CNM-CC-730-036/2003, CNM-CC-730-037/2003 y CNM-CC-730-038/2003 de Marzo/03 del Centro Nacional de Metrología de México (CENAM)

Las incertidumbres combinadas fueron calculadas tomando en cuenta las contribuciones de los patrones del laboratorio y de la resolución de la balanza.

Las incertidumbres expandidas están calculadas usando un factor de cobertura  $k = 2$ .

El presente certificado solo ampara las mediciones reportadas en el momento y las condiciones en que se realizó la calibración.

San Salvador, 23 de Noviembre de 2007.

  
Ing. Claudia Alejandrina Estrada  
Técnico Metrólogo

  
Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe



3/3

**Laboratorio Nacional de Metrología Legal**  
*Certificado de Caracterización*

Registro:   
RT-007/07

Se refiere a:

Objeto de la Calibración: ESTUFA

Marca: RAYPA

Numero Activo fijo: 12060-0204-078-0009

Número de inventario: PRE-01-172-01

Número de serie: S/N

Fecha de la medición: 07/11/23

Está constituido de: 3 páginas.

Destinatario: CENSALUD.  
Ciudad Universitaria, Final 25 Avenida Norte, San  
Salvador, El Salvador, Centro América

Solicitado por: CENSALUD.

Fecha: 07/11/23

  
Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe

## Laboratorio Nacional de Metrología Legal

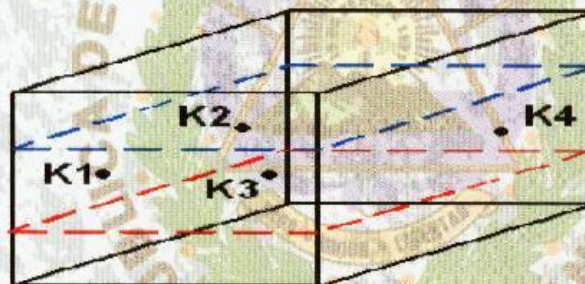
### *Certificado de Caracterización*

El Laboratorio Nacional de Metrología Legal de El Salvador hace constar, que a solicitud de la **CENSALUD**, se Caracterizó una estufa, la cual posee las características siguientes:

Marca: RAYPA  
 Nº DE ACTIVO: 12060-0204-078-0009  
 Nº de Inventario: PRE-01-172-01

La estufa fue caracterizada introduciendo cuatro termocuplas flexibles tipo **K** (**COLE PARMER**) en la recámara según detalle, las cuales fueron conectadas a un Multiméetro digital marca **KEITHLEY** modelo 2000.

Los resultados obtenidos fueron:



TEMPERATURA DE PRUEBA	TEMPERATURA DEL INDICADOR	K1(°C)	K2(°C)	K3(°C)	K4(°C)	TEMPERATURA PROMEDIO(°C)
169.0°C	169.0°C	166.78	167.01	167.59	167.06	167.11

## Laboratorio Nacional de Metrología Legal

### *Certificado de Caracterización*

La incertidumbre expandida de las temperaturas es de  $\pm 0,08$  °C, la cual fue calculada para un intervalo de confianza de aproximadamente el 95%.

La cadena de trazabilidad está garantizada por el patrón de trabajo con certificado N° TC-005/07 de Noviembre/2007 del LABORATORIO NACIONAL DE METROLOGÍA LEGAL (EL SALVADOR), trazadas al patrón de referencia con certificado N° CNM-CC-420-224/2005 del CENTRO NACIONAL DE METROLOGIA (CENAM), de MEXICO.

El presente certificado solo ampara las mediciones reportadas en el momento y condiciones en que se realizó la caracterización.

San Salvador, 23 de Noviembre del 2007.



Jorge A. Medrano  
Metrólogo



Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe

**Laboratorio Nacional de Metrología Legal**  
*Certificado de Caracterización*

Registro:   
RT-008/07

Se refiere a:

Objeto de la Calibración: ESTUFA

Marca: RAYPA

Numero Activo fijo: 12060-0204-078-0010

Número de inventario: PRE-02-172-02

Número de serie: S/N

Fecha de la medición: 07/11/23

Está constituido de: 3 páginas.

Destinatario: CENSALUD.  
Ciudad Universitaria, Final 25 Avenida Norte, San  
Salvador, El Salvador, Centro América

Solicitado por: CENSALUD.

Fecha: 07/11/23



  
Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe

## Laboratorio Nacional de Metrología Legal

### *Certificado de Caracterización*

El Laboratorio Nacional de Metrología Legal de El Salvador hace constar, que a solicitud de la **CENSALUD**, se Caracterizó una estufa, la cual posee las características siguientes:

Marca: RAYPA  
 Nº DE ACTIVO: 12060-0204-078-0010  
 Nº de Inventario: PRE-02-172-02

La estufa fue caracterizada introduciendo cuatro termocuplas flexibles tipo K (COLE PARMER) en la recámara según detalle, las cuales fueron conectadas a un Multiméetro digital marca KEITHLEY modelo 2000.

Los resultados obtenidos fueron:



TEMPERATURA DE PRUEBA	TEMPERATURA DEL INDICADOR	K1(°C)	K2(°C)	K3(°C)	K4(°C)	TEMPERATURA PROMEDIO(°C)
170.0°C	163.0°C	161.96	161.90	163.28	161.89	162.26



## Laboratorio Nacional de Metrología Legal

### *Certificado de Caracterización*

La incertidumbre expandida de las temperaturas es de  $\pm 0,11$  °C, la cual fue calculada para un intervalo de confianza de aproximadamente el 95%.

La cadena de trazabilidad está garantizada por el patrón de trabajo con certificado N° TC-005/07 de Noviembre/2007 del LABORATORIO NACIONAL DE METROLOGÍA LEGAL (EL SALVADOR), trazadas al patrón de referencia con certificado N° CNM-CC-420-224/2005 del CENTRO NACIONAL DE METROLOGIA (CENAM), de MEXICO.

El presente certificado solo ampara las mediciones reportadas en el momento y condiciones en que se realizó la caracterización.

San Salvador, 23 de Noviembre del 2007

Jorge A. Medrano  
Metrólogo



Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe

## ANEXO 14

Certificados de calibración de material realizados por el Laboratorio de  
Metrología Legal del CONACYT.

**Laboratorio Nacional de Metrología Legal**  
*Certificado de Calibración*

Registro:   
CV-038/07

Se refiere a:

Objeto de la Calibración: Matraz de 100 mL de capacidad

Marca: POBEL

Clase: B

Tipo de Calibración: Para contener

Número de serie: S/Nº

Número de Identificación: S/Nº

Fecha de la medición: 07/12/17

Está constituido de: 2 páginas

Destinatario: CEN – SALUD, UES.  
Ciudad Universitaria, Final 25 Avenida Norte,  
San Salvador El Salvador, C. A.

Solicitado por: CEN – SALUD, UES.

Fecha: 07/12/17



  
Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe

1/2

## Laboratorio Nacional de Metrología Legal

### *Certificado de Calibración*

El Laboratorio Nacional de Metrología Legal CERTIFICA: que a solicitud de **CEN – SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**, se calibró un matraz de 100 mL de capacidad nominal.

Dicho matraz fue calibrado en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Metrología Legal.

El procedimiento usado fue el Gravimétrico y consistió en limpiar el matraz con agua destilada y luego fue secado completamente. Posteriormente, se procedió a determinar la masa del matraz seco; después, se determinó la masa del matraz lleno de agua destilada hasta la marca de aforo, obteniéndose el resultado siguiente:

**$V = (100,101\ 1 \pm 0,003\ 8)$  mL a la temperatura de 20 °C**

La trazabilidad está garantizada por los patrones de masa con número de certificado CM-030/07 de Enero/07 pertenecientes al "Laboratorio Nacional de Metrología Legal" de El Salvador.

La incertidumbre expandida de las lecturas del volumen están calculadas con un nivel de confianza de aproximadamente el 95%, correspondiendo a un factor de cobertura de  $k = 2$ .

El presente certificado solo ampara las mediciones reportadas en el momento y condiciones en que se realizó la calibración.

San Salvador, 17 de Diciembre de 2007.

  
Ing. Claudia Alejandrina Estrada  
Técnico Metrólogo

  
Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe



2/2

Laboratorio Nacional de Metrología Legal  
*Certificado de Calibración*

Registro:   
CV-037/07

Se refiere a:

Objeto de la Calibración: Pipeta graduada de 1 mL de capacidad

Marca: KIMAX

Clase: -

Tipo de Calibración: Para entregar

Número de serie: 37033

Número de Identificación: S/Nº

Fecha de la medición: 07/12/17

Está constituido de: 2 páginas

Destinatario: CEN – SALUD, UES  
Ciudad Universitaria, Final 25 Avenida Norte,  
San Salvador El Salvador, C. A.

Solicitado por: CEN – SALUD, UES

Fecha: 07/12/17



  
Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe

1/2

## Laboratorio Nacional de Metrología Legal

### *Certificado de Calibración*

El Laboratorio Nacional de Metrología Legal CERTIFICA: que a solicitud de **CEN – SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**, se calibró una pipeta graduada de 1 mL de capacidad nominal.

Dicha pipeta fue calibrada en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Metrología Legal.

El procedimiento utilizado fue el Gravimétrico y consistió en determinar la masa de agua hasta la marca de aforo, para lo cual se humedecieron las paredes de la pipeta; luego, se aforó con agua destilada, se descargó en un beaker y se pesó utilizando la balanza AE 240S, repitiendo este procedimiento cinco veces para cada uno de los puntos de calibración. Obteniéndose los resultados siguientes:

$$V = (0,995\ 8 \pm 0,002\ 9) \text{ mL a la temperatura de } 20\ ^\circ\text{C}$$

La trazabilidad está garantizada por los patrones de masa con número de certificado CM-030/07 de Enero/07 pertenecientes al "Laboratorio Nacional de Metrología Legal" de El Salvador.

La incertidumbre expandida de las lecturas del volumen están calculadas con un nivel de confianza de aproximadamente el 95%, correspondiendo a un factor de cobertura de  $k=2$ .

El presente certificado solo ampara las mediciones reportadas en el momento y condiciones en que se realizó la calibración.

San Salvador, 17 de Diciembre de 2007

  
Ing. Claudia Alejandrina Estrada  
Técnico Metrólogo

  
Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe



2/2

**Laboratorio Nacional de Metrología Legal**  
*Certificado de Calibración*

Registro:   
CV-036/07

Se refiere a:

Objeto de la Calibración: Pipeta graduada de 10 ml. de capacidad

Marca: PYREX

Clase: -

Tipo de Calibración: Para entregar

Número de serie: 7087

Número de Identificación: S/Nº

Fecha de la medición: 07/12/17

Está constituido de: 2 páginas

Destinatario: CEN – SALUD, UES  
Ciudad Universitaria, Final 25 Avenida Norte,  
San Salvador El Salvador, C. A.

Solicitado por: CEN – SALUD, UES.

Fecha: 07/12/17



  
Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe

1/2

## Laboratorio Nacional de Metrología Legal

### *Certificado de Calibración*

El Laboratorio Nacional de Metrología Legal CERTIFICA: que a solicitud de **CEN – SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**, se calibró una pipeta graduada de 10 mL de capacidad nominal.

Dicha pipeta fue calibrada en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Metrología Legal.

El procedimiento utilizado fue el Gravimétrico y consistió en determinar la masa de agua hasta la marca de aforo, para lo cual se humedecieron las paredes de la pipeta; luego, se aforó con agua destilada, se descargó en un beaker y se pesó utilizando la balanza AE 240S, repitiendo este procedimiento cinco veces para cada uno de los puntos de calibración. Obteniéndose los resultados siguientes:

$$V = (10,038\ 5 \pm 0,028\ 9) \text{ mL a la temperatura de } 20\ ^\circ\text{C}$$

La trazabilidad está garantizada por los patrones de masa con número de certificado CM-030/07 de Enero/07 pertenecientes al "Laboratorio Nacional de Metrología Legal" de El Salvador.

La incertidumbre expandida de las lecturas del volumen están calculadas con un nivel de confianza de aproximadamente el 95%, correspondiendo a un factor de cobertura de  $k = 2$ .

El presente certificado solo ampara las mediciones reportadas en el momento y condiciones en que se realizó la calibración.

San Salvador, 17 de Diciembre de 2007.

  
Ing. Claudia Alejandrina Estrada  
Técnico Metrólogo

  
Ing. Douglas Edgardo Brito Hurtado  
Jefe



2/2

## ANEXO 15

### Ensayos fluorogénicos para determinación de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*.



Fig. 3. Viraje de color de caldo LMX a 24 h. de incubación con *E. coli*.



Fig. 4. Fluorescencia de *E. coli* en caldo LMX.

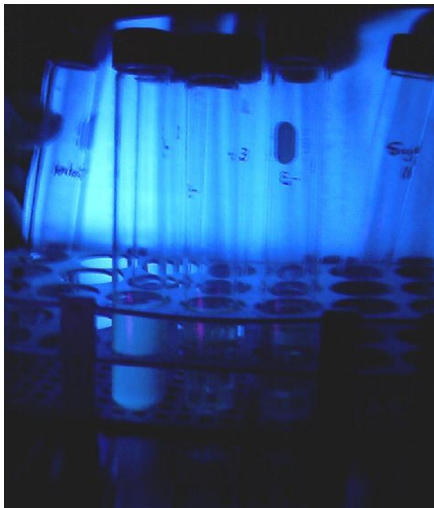


Fig. 5. Prueba de límite de detección.



Fig. 6. Formación de gas en caldo LMX por acción de *E. coli*.

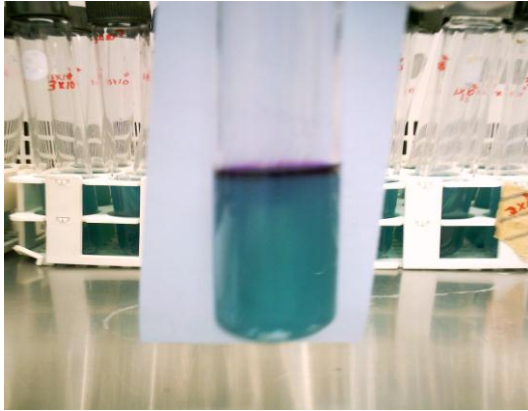


Fig. 7. Formación de anillo indólico en caldo LMX.

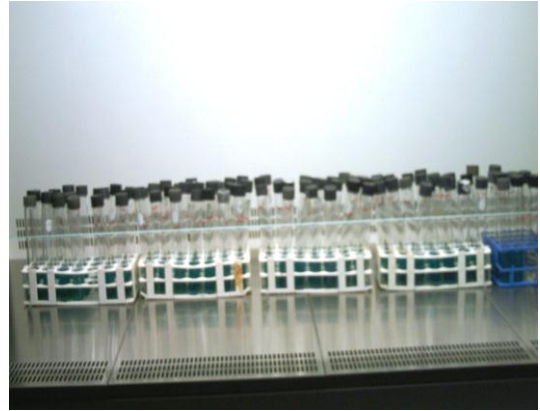


Fig. 8. Ensayos de precisión para método de NMP.

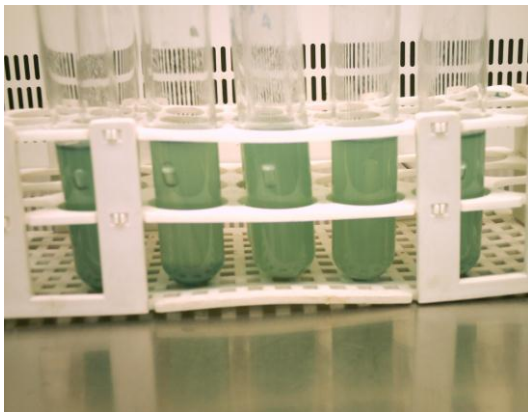


Fig. 9. Falsos negativos para NMP.

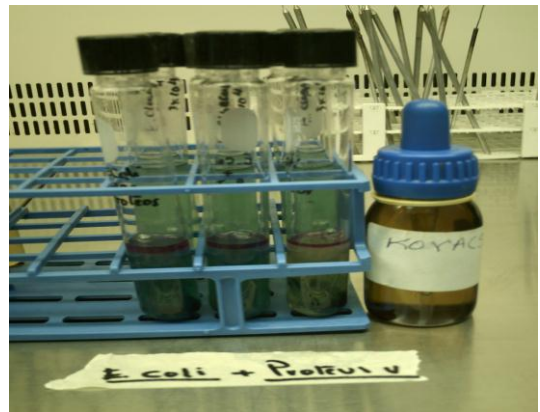


Fig. 10. Confirmación de *E. coli* por formación de anillo indólico.



Fig. 11. Fluorescencia para ensayo de falsos negativos.

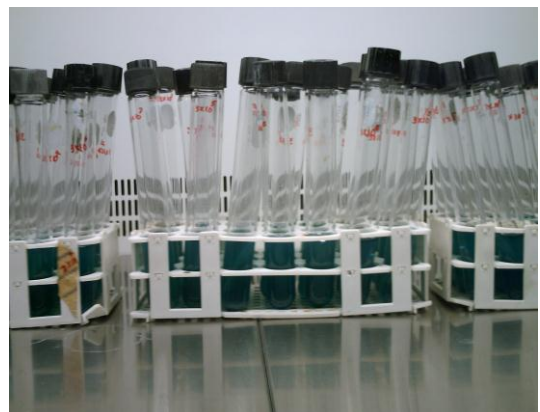


Fig. 12. Ensayos de exactitud para método. NMP.



Fig. 13. *Pseudomona aeruginosa* en caldo Fluorocult® para exclusividad.



Fig. 14. Ausencia de fluorescencia para ensayo de exclusividad.

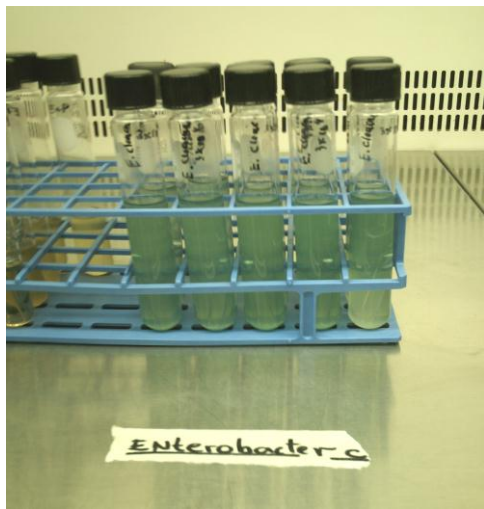


Fig. 15. *Enterobacter cloacae* en Fluorocult® para inclusividad del método.



Fig. 16. Ausencia de fluorescencia para ensayo de inclusividad.

## ANEXO 16

### Ensayos convencionales para determinación de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*.



Fig. 17. Prueba presuntiva (+) para coliformes en caldo LST.



Fig. 18. Prueba confirmativa (+) para coliformes en caldo BRILLA.

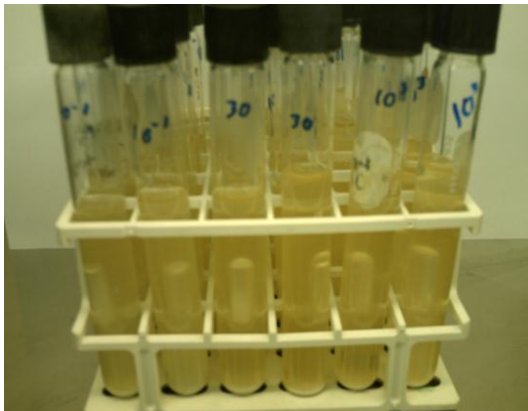


Fig. 19. Prueba para coliformes fecales en medio EC.

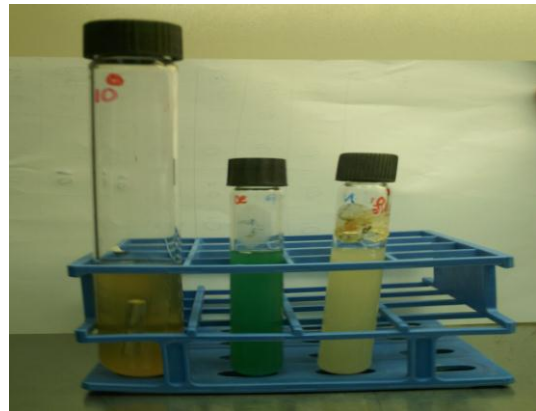


Fig. 20. Resultados falsos negativos para el método convencional.

## ANEXO 17

### Calibración de equipos y cristalería desarrollados por el Laboratorio Nacional de Metrología Legal



Fig. 21. Calibración de baño María.

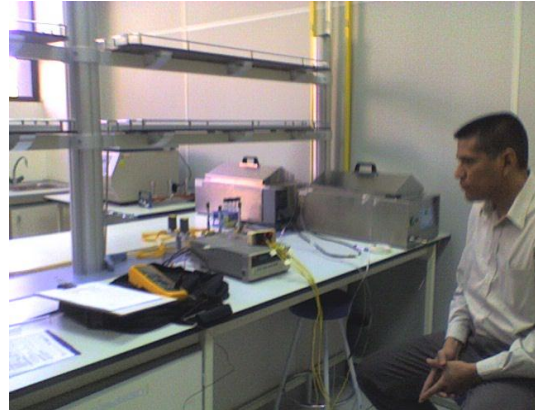


Fig. 22. Medición de temperatura de baño María.



Fig. 23. Calibración de incubadora de Laboratorio de Aguas CENSALUD.

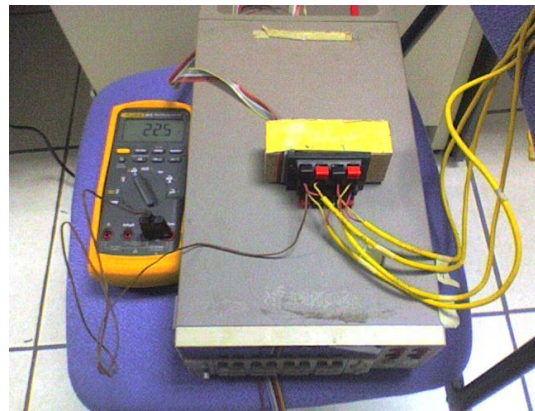


Fig. 24. Medición de temperatura de incubadora.



Fig. 25. Calibración de estufas.



Fig. 26. Calibración de balanza granataria.



Fig. 27. Patrones de peso para calibración de balanzas.



Fig. 28. Indicador biológico para calibración de autoclave.

**3M™ Attest™ 1262/1262P**  
**Indicador biológico**  
**DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO:**  
 El indicador biológico 1262 3M Attest (tapa blanca) está diseñado para esterilización con vapor.  
 La presencia de esporas de *Bacillus pterodermatophilus* es detecta a simple vista (el cambio de color amarillo indica que se ha producido la esterilización). La lectura final de un resultado negativo se obtiene después de 48 horas de incubación del indicador.  
**FRECUENCIA DEL CONTROL:**  
 Para asegurar el mantenimiento del proceso de esterilización, los indicadores se colocarán en una bandeja o en un paquete de prueba adecuado, que reprens y deben usarse para el control de cada carga.  
**CONTRAINDICACIONES:** Ninguna.  
**ADVERTENCIA:**  
 No use ampolla de vidrio dentro del frasco pequeño de plástico del indicador.  
 • Compruebe o manipule en manos el indicador biológico antes de que se abra la ampolla de vidrio.  
 • Use guantes protectores y guantes de seguridad al manipular el indicador biológico.  
 • Manipule los indicadores biológicos teniendo en cuenta la etiqueta de contaminación.  
 • No utilice los dedos para manipular la ampolla de vidrio.  
 • No haga girar el indicador biológico sobre los dedos para humedecer la tapa.  
**PRECAUCIONES:**  
 No use el indicador biológico 1262 Attest para el control de:  
 1. Cargas de esterilización con vapor por gravedad a 121°C (250°F), durante el ciclo.  
 2. Esterilizadores con calor seco, vapor químico, flujo de aire o otros métodos.  
**INSTRUCCIONES PARA EL USO:**  
 1. Identifique el indicador biológico Attest asociado en la etiqueta del indicador antes de la carga y la fecha de procesamiento.  
 2. Coloque un indicador biológico Attest en forma horizontal o con el tapón hacia un paquete de prueba adecuado (de acuerdo con las pautas recomendadas).  
**Paquete de prueba:** procesados a 121°C (250°F) durante 2-30 minutos en un autoclave a 15 PSI (1.1 bar) o a 121°C (250°F) durante 2-30 minutos en un autoclave por flujo de aire a 15 PSI (1.1 bar).  
 3. Incubación: 1262 Attest en un paquete de 14 horas después por la