

Criterios para la acreditación de laboratorios que realizan ensayos microbiológicos según NC-ISO/IEC 17025:00

Marlen Robert Pullés, Rogelio Mayarí Navarro y Victoria Martínez Morales.

Dpto. de Estudios sobre Contaminación Ambiental, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 11 de noviembre de 2004. Aceptado: 18 de julio de 2005.

Palabras clave: acreditación, evaluación, ISO, coliformes totales, coliformes fecales.
Key words: accreditation, evaluation, ISO, total coliforms, fecal coliforms.

RESUMEN. En los últimos años, la búsqueda de indicadores del grado de contaminación microbiana de una muestra de agua, es uno de los aspectos en que más énfasis se ha hecho en los laboratorios de análisis de agua y aguas residuales. Es de vital importancia en la microbiología ambiental contar con un control de la calidad, dentro del cual, debe considerarse el método de ensayo, de modo que se garantice una óptima calidad de los datos resultantes. La determinación cuantitativa de la presencia de coliformes ofrece un índice racional del contenido bacteriano del agua. El presente trabajo tuvo como objetivo precisar los criterios requeridos para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos según NC-ISO/IEC 17025:00, referido a los ensayos microbiológicos de coliformes totales y fecales en aguas y aguas residuales mediante la técnica de tubos múltiples de fermentación. Esta norma constituye la base técnico-metodológica para la acreditación de estos ensayos. Para la evaluación de los laboratorios con vistas a su acreditación, se analizaron los factores que pueden influir sobre los resultados. Se puntualiza que los factores de mayor incidencia a tener en cuenta para la acreditación son: los de un servicio con los requisitos que demanda un cliente o usuario: locales y condiciones ambientales, los medios de cultivo y reactivos, la validación del método y verificación de los resultados, el aseguramiento de la calidad de los resultados y control de la calidad, la manipulación e identificación de muestras y estimación de la incertidumbre, lo cual, constituye una base objetiva e indispensable en el proceso de evaluación de la conformidad.

ABSTRACT. In the last years, the search of indicators of the grade of microbial contamination of a sample of water is one of the aspects in which more emphasis has been made in the laboratories of analysis of waters and wastewaters. It is of vital importance in the environmental microbiology to have a control of the quality, inside which should be considered the analytical method, so a good quality of the resulting data is guaranteed. The quantitative determination of the coliforms presence offers a rational index of the bacterial content of the water. This work, had as objective to specify the approaches for the accreditation of laboratories that carry out microbiological analysis according to NC-ISO/IEC 17025:00, referred to the microbiological rehearsals of total and fecal coliforms in waters and wastewaters by means of the technique of Multiple Tubes of Fermentation. This standard constitutes the technical-methodological basis for the accreditation of these rehearsals. For the evaluation of these laboratories with a view to their accreditation, the factors that can influence on the results was analyzed. It is specify the factors of more incidence to keep in mind for the accreditation are: the local and environmental conditions, the culture media and reagents, the validation of the method and verification of the results, the insurance of the quality of the results and control of the quality, the manipulation and identification of samples and estimatimation of the uncertainty, that constitutes an objective and indispensable basis in the process of evaluation of the conformity of a service for the requirements a consumers demands.

INTRODUCCION

Los análisis microbiológicos incluyen ensayos de esterilidad, detección, aislamiento, recuento e identificación de microorganismos y sus metabolitos en diferentes materiales y productos de cualquier otro tipo en el que utilicen microorganismos como parte de un sistema de detección.

La búsqueda de indicadores del grado de contaminación microbiana de una muestra de agua, es uno de los aspectos en que más énfasis se ha hecho en los laboratorios de análisis de agua y aguas residuales. La presencia de determinados grupos bacterianos ha sido utilizada hasta ahora como un índice de contaminación. Entre las enfermedades más comunes que se pueden contraer por contacto o ingestión de aguas contaminadas microbiológicamente se encuentran las ocasionadas por los coliformes.¹

La norma ISO/IEC 17025 constituye la base técnico-metodológica para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Por la importancia y alcance de esta nueva norma internacional, es necesario un enfoque acerca de su imprescindible asimilación en la economía, teniendo en cuenta que el ensayo y la calibración de los instrumentos de medición son la base objetiva e indispensable en el proceso de evaluación de la conformidad de un servicio con los requisitos que demanda un cliente o usuario.²

Actualmente, existe en Cuba una problemática derivada de la falta de la información fundamental acerca de los requisitos para la acreditación de laboratorios que realizan ensayos microbiológicos.^{3,4}

El presente trabajo tuvo como objetivo precisar los criterios requeridos para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos según NC-ISO/IEC 17025:00.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar los criterios para la acreditación de laboratorios que realizan ensayos microbiológicos según NC-ISO/IEC 17025:00, se analizaron los factores que pueden influir sobre los resultados, entre ellos: los locales y las condiciones ambientales, los medios de cultivo y reactivos, la validación del método y la verificación de los resultados; el aseguramiento y control de la calidad de los resultados; la manipulación e identificación de muestras y estimación de la incertidumbre.⁵⁻⁷

RESULTADOS Y DISCUSION

Para determinar la conformidad de cada uno de estos factores, se debe analizar el cumplimiento de los requisitos técnicos de la NC ISO/IEC 17025:00 por los laboratorios que realizan ensayos microbiológicos que se resume a continuación.

Locales

La ubicación, el diseño y la distribución de las diferentes dependencias del laboratorio debe ser tal, que el peligro de contaminación de las muestras, ya sea derivado de las condiciones ambientales, contaminación cruzada u otras causas, sea mínimo.

Una de las formas más efectivas de reducir al mínimo el riesgo de contaminación cruzada es mediante la construcción del laboratorio según un diseño "sin camino de regreso". Cuando esto no sea posible, deben tomarse medidas alternativas, como las siguientes:

- Realizar los procedimientos de manera secuencial, tomando las debidas precauciones para garantizar la integridad de los ensayos y de las muestras.
- Separación de actividades en tiempo y espacio.

La literatura especializada recomienda que los laboratorios dispongan de dos tipos de dependencias:

- Áreas auxiliares (oficinas de administración, locales de aseo,

guardarropas, almacenes, archivos, etcétera).

- Áreas de ensayo, donde se lleven a cabo las actividades específicas del laboratorio de microbiología.

En general, es conveniente que existan áreas separadas o claramente designadas para la recepción, conservación y preparación de muestras; analíticas diferenciadas de las de apoyo, para la preparación de medios de cultivo y reactivos, esterilización y descontaminación; almacenamiento y lavado de material, etcétera.

El área de lavado (después de la descontaminación) puede compararse con otras partes del laboratorio, siempre que se tomen las debidas precauciones para evitar la transferencia de trazas de sustancias que puedan afectar negativamente el crecimiento microbiano. La conveniencia de la separación física debe juzgarse, considerando los indicadores específicos del laboratorio, por ejemplo: número y tipo de ensayos realizados entre otros).

Los locales deben presentar condiciones adecuadas de acuerdo con las normas vigentes y las Buenas Prácticas de Laboratorio y disponer de un registro diario de su comportamiento. Cada uno estará debidamente señalizado e identificado (Tabla 1).

Referentes al diseño

Para reducir el riesgo de contaminación y facilitar las labores de limpieza y desinfección, se recomienda a título de ejemplo, un conjunto de medidas. Estas no son exhaustivas y no todas podrán aplicarse en todas las situaciones.

Las áreas de trabajo deben ser suficientemente espaciales como para poder mantenerse limpias y ordenadas. El espacio, dependerá del volumen de análisis a realizar y de la organización interna del laboratorio; requerirá uniones cóncavas entre suelo, paredes y techos; iluminación empotrada en estos techos: Además, de una buena ventilación, lo que puede lograrse mediante ventilación natural o forzada, o el uso

de acondicionadores de aire, equipados con filtros para el polvo en la entrada de aire y disponer de suficiente espacio para almacenamiento.

El empleo de tuberías es otro de los elementos a tener en cuenta para transportar líquidos que no deben pasar por encima de las superficies de trabajo, a no ser que estén provistas de un revestimiento herméticamente sellado. No se recomienda el empleo de cortinas y persianas internas en las ventanas.

Referentes a materiales

Asimismo, las paredes, techos, suelos y superficies de trabajo deben ser lisas, de material no absorbente y fácil de limpiar y desinfectar. Las superficies de madera de instalaciones y accesorios deben estar debidamente protegidas y selladas, evitar las maderas rugosas y sin revestir. No se recomiendan los azulejos como material de recubrimiento de las superficies de trabajo.

De acuerdo con el tipo de ensayo, la apertura de puertas y ventanas debe ser mínima. Los armarios, estanterías, equipos y material de laboratorio deben estar colocados de forma que se evite la acumulación de polvo y se facilite su limpieza. Se recomienda el uso de armarios hasta el techo.

Para facilitar las labores de limpieza, los teléfonos y ordenadores que se encuentren dentro del área de ensayo pueden estar provistos de un protector. El sistema de ventilación de los equipos informáticos debe estar orientado de manera que se evite la contaminación. Por ejemplo, el flujo de aire no debe dirigirse hacia las superficies de trabajo; utilizar lavamanos de accionamiento no manual.

Cuando el trabajo en condiciones estériles sea limitado o tenga lugar solo ocasionalmente, puede ser suficiente utilizar una superficie de trabajo limpia, siempre que se apliquen técnicas asépticas rigurosas, establecer un programa normalizado de limpieza y desinfección

Tabla 1. Estructura organizativa de un laboratorio de Microbiología.

Local	Descripción de las funciones de trabajo
13	Zona de fregado y preparación del material a esterilizar y del equipo.
28	Zona de preparación de medios de cultivo, disoluciones y diluciones necesarias.
12	Zona o cuarto de siembra con temperatura controlada para transferir los cultivos microbianos o manipular materiales patógenos.

del laboratorio que tenga en cuenta los resultados de vigilancia de las condiciones ambientales y la posibilidad de contaminación cruzada.

Dependiendo del tipo de ensayo que se realice, por ejemplo, el método de Coliformes Totales y Fecales, el acceso al laboratorio debe restringirse al personal estrictamente autorizado; tener la indumentaria apropiada y despojarse una vez terminado el trabajo, de la vestimenta.

Condiciones ambientales

Si se detecta una posible contaminación, deben definirse los recuentos máximos de microorganismos que se consideren aceptables y establecer medidas para corregir las situaciones en que sobrepasen estos límites. Entre las medidas se encuentran:

- Limpieza y desinfección a fondo del laboratorio, incluyendo superficies de trabajo y filtros del aire acondicionado.
- Incremento de la frecuencia de las operaciones de limpieza y desinfección.
- Modificaciones en los procedimientos de limpieza y desinfección.
- La instalación de unidades de aire acondicionado.

Cuando la contaminación es cruzada, causada por los equipos, el material desechable y de vidrio reutilizable debe estar limpio o estéril, en función de su uso, lo ideal es que los laboratorios dispongan de más de una autoclave. Sin embargo, siempre que se tomen las debidas precauciones para separar las cargas de descontaminación y esterilización y cuando exista un programa normalizado de limpieza para controlar las condiciones ambientales, tanto externas como internas de la autoclave, el laboratorio puede utilizar una única autoclave.

Medios de cultivo y reactivos

El uso de controles adicionales con carácter aleatorio, para asegurar que los productos siguen cumpliendo las especificaciones requeridas puede incluirse en el programa interno de control de calidad.

Los medios de cultivo, productos en polvo deshidratados y reactivos comerciales deben consumirse antes de la fecha de caducidad. Entre los registros de uso permanente se encuentran: la fecha de recepción, caducidad y de apertura del envase.

Se ha comprobado que el almacenamiento adecuado de los reacti-

vos y medios de cultivo en todos los envases, su hermeticidad y la preparación de los medios, disoluciones y estabilizadores, utilizando agua destilada desionizada o de ósmosis inversa, sometida a controles periódicos, aseguran su calidad (conductividad, pH y contaminación microbiana).

Los documentos de la familia ISO, incluyen un conjunto de directrices para la preparación y esterilización de medios, así como los tiempos de almacenamiento recomendados. Asimismo, debe identificarse a la persona que ha preparado el medio o reactivo.

Validación de métodos y verificación de los resultados

Los sistemas de ensayo que se venden en el mercado (kits) pueden no requerir una nueva validación si se dispone de datos sobre validación procedentes de fuentes alternativas. El laboratorio debe solicitar a los fabricantes datos sobre validación y evidencias de que cumplen un sistema reconocido de calidad. Cuando no se disponga de todos los datos se completará la validación del método antes de utilizarlo con carácter rutinario.^{6,7}

En algunos laboratorios del país se utiliza como temperatura de incubación 35 a 37 °C para el método de ensayo de "Determinación de coliformes totales y fecales en aguas y aguas residuales mediante la técnica de tubos múltiples de fermentación". Sin embargo, el método de referencia (APHA, 1998) hace énfasis en una temperatura de incubación de 35 °C, lo que origina una variación en el método empleado.⁹⁻¹¹

De este modo, se solucionaría el problema de la validación del método, empleando fuentes alternativas como las NC 26-121-1: 93, NC 93-01-128:88 y NC 76-04-3:82 que establecen la temperatura de incubación en el intervalo de 35 a 37 °C.

Cuando se haya realizado una validación, se verificará periódicamente su comportamiento, utilizando muestras inoculadas. Se realizará el análisis de los registros de resultados, lo que permite llegar a un criterio evaluativo de ellos.

Aseguramiento de la calidad de los resultados

Tradicionalmente, la forma de evaluar microbiológicamente la calidad de las aguas consiste en el conteo de coliformes, procedimiento que permite evidenciar su posible contaminación. La determinación

cuantitativa de la presencia de coliformes ofrece un índice racional del contenido bacteriano del agua.

Para demostrar la trazabilidad se emplean cepas de referencia de microorganismos suministrados por una colección nacional o internacional reconocida.

Los materiales de referencia y los de referencia certificada proporcionan la trazabilidad esencial en las mediciones y son utilizados, por ejemplo, para demostrar la precisión de los resultados, calibrar equipos, permitir la comparación de métodos al ser utilizados como patrones de referencia.

En caso de que el Instituto Nacional de Investigaciones Metrológicas no cuente con las condiciones para calibrar o verificar los equipos e instrumentos de medición, una alternativa, la ofrecen los métodos desarrollados en el laboratorio⁶ con el empleo de materiales de referencia internos certificados, de cepas o comparación con métodos de referencia, los cuales permiten garantizar la trazabilidad.

Interpretación de los resultados

Método de ensayo de coliformes totales y fecales

En el resultado del ensayo de "Determinación de coliformes totales y fecales en aguas y aguas residuales mediante la técnica de tubos múltiples de fermentación" en la prueba presuntiva se observa la aparición de gas y ácido en uno de los tubos a las (48 ± 3) h, lo que constituye una presunta reacción positiva (Fig. 1).

Los tubos con este tipo de reacción deben ser estudiados en la fase confirmatoria.

En esta fase se observa la aparición de gas en un medio EC a las 24 h de incubación, lo que confirma una reacción positiva, la presencia de coliformes de origen fecal (Tubo 1, Fig. 1)

La formación de cierta cantidad de gas en el vial invertido en el medio verde brillante de lactosa bilis a las (48 ± 3) h de incubación, indica un resultado positivo en la fase confirmatoria, es decir, confirma la presencia de organismos Coliformes Totales⁹⁻¹¹ (Tubo 1, Fig. 2)

Control de calidad externo (ensayo de aptitud)

Los programas de ensayos de aptitud organizados externamente constituyen un medio independiente por el cual se puede evaluar objetivamente y demostrar la fiabilidad y precisión de los resultados obteni-



Fig. 1. Prueba presuntiva.



Fig. 2. Fase confirmatoria.

dos con este método analítico como una manera de comprobar la calidad de los ensayos y adoptar las medidas oportunas, si son necesarias.

Manipulación e identificación de muestras

El muestreo es uno de los factores de mayor importancia que incide en la interpretación de los resultados microbiológicos, por tal motivo, el laboratorio debe tener un esquema de muestreo que asegure el cumplimiento de las normas que se apliquen.

Hay que tener en cuenta que la flora microbiana¹¹ puede ser sensible a factores tales como la temperatura o la duración del almacenamiento y de la transportación, por lo que es importante verificar y registrar el

estado de la muestra cuando se recibe y cuando se encuentra a la espera de ser analizada debe conservarse en condiciones adecuadas para reducir al mínimo, cualquier modificación en la población microbiana presente.

El laboratorio debe disponer de un procedimiento que incluya la entrega de muestras. Si es insuficiente o si se encuentra en mal estado, debido a deterioro físico, temperatura incorrecta, envase roto o etiquetado defectuoso, debe rechazarse o (si es posible realizar el trabajo) describir su estado en el informe del ensayo.

El envase y etiquetado de las muestras puede estar potencialmente muy contaminado por lo que su manipulación y almacenamien-

to se realizará con precaución para evitar que se propague la contaminación.

Incertidumbre de la medición

El grado en el que los factores de mayor incidencia pueden influir sobre los resultados contribuyen a la incertidumbre de la medición^{14,15} y difiere considerablemente entre los tipos de ensayos empleados, por tal motivo, se toman en cuenta estos factores en el desarrollo de los métodos y los procedimientos, así como en el entrenamiento y calificación del personal y en la selección y calibración de los equipos que se utilizan.

El cálculo de la incertidumbre en esta materia está siendo abordado actualmente por la comunidad de laboratorios y se espera que en un futuro se disponga de unas directrices más claras en el campo de la Microbiología.

CONCLUSIONES

El trabajo ha permitido precisar los factores de mayor incidencia a tener en cuenta para los laboratorios que realizan ensayos microbiológicos según NC ISO/IEC 17025:00 (locales y condiciones ambientales, los medios de cultivo y reactivos, la validación del método y verificación de los resultados, el aseguramiento de la calidad de los resultados y control de la calidad, la manipulación e identificación de muestras), lo cual constituye una base objetiva e indispensable en el proceso de evaluación de la conformidad de un servicio por los requisitos que demanda un cliente o usuario.

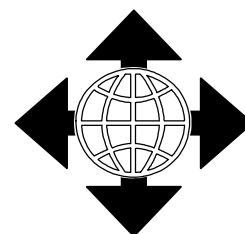
El material brinda una información que ayuda a resolver la problemática relacionada con la acreditación de los laboratorios de microbiología y sirve de guía para los laboratorios que utilizan técnicas en áreas relacionadas con la bioquímica, la biología molecular y los cultivos celulares.

BIBLIOGRAFIA

1. APHA, AWWA WEF. Standard Methods for the examination of waters and wastewaters 20th edition, USA, 1998.
2. NC-ISO 17025:2000. Requisitos para la competencia técnica de los laboratorios de calibración y ensayo. Oficina Nacional de Normalización (ONN), La Habana, Cuba, 2000.
3. Torres M., Treto R. Experiencias en la acreditación del Centro Territorial de Metrología de Villa Clara. **Revista de Normalización**, Oficina Nacional de Normalización, No. 2, 3, 2002.
4. Marrero M., Molina D., Pérez I., Fernández M., Walwyn G. Proceso de acre-

- ditación por la NC-ISO/IEC 17025:00 de los principales laboratorios del Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones. Revista de la Agencia de Energía Nuclear y Tecnologías de Avanzada de Cuba, No. 34, 7, 2003.
5. Espinosa M.C., Ramos C., Mayarí R., Ruiz M., Correa O., Rodríguez X., González E., Goslin K., Gómez C. y Cordero L. Aplicación del control de la calidad en un laboratorio de análisis de aguas y aguas residuales. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, 29, 1, 1998.
 6. Mayarí R., Espinosa M.C., Torres J. y Ruiz M. Aplicación de un esquema de validación en la determinación de Oxígeno Disuelto (OD) por el método del electrodo de membrana. Contribución a la Educación y la Protección Ambiental, 2, VII Taller, 2001.
 7. ENAC. Guía para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos. G-ENAC-04 Revisión. 3, noviembre de 2002. Hoja 1 de 18. Entidad Nacional de Acreditación, EUA.
 8. NC 26-212:92. Buenas prácticas de laboratorio. Comité Estatal de Normalización, Cuba.
 9. NC 93-01-128:88. Determinación del número más probable de coliformes totales y coliformes fecales. Comité Estatal de Normalización, Cuba.
 10. NC 76-04-3:82. Determinación de microorganismos coliformes. Comité Estatal de Normalización, Cuba.
 11. NC 26-121-1:93. Características microbiológicas. Comité Estatal de Normalización, Cuba.
 12. NC 93-02:85. Higiene comunal. Agua potable. Requisitos sanitarios y muestreos. Comité Estatal de Normalización, Cuba.
 13. ICONTEC 1433:78. Agua Potable. Ensayos bacteriológicos. Comité Estatal de Normalización, Cuba.
 14. EURACHEM/CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2nd Edition, 2000.
 15. Mayarí R., Espinosa M. del C., Pedro S., Correa O. Evaluación de dos procedimientos en la estimación de la incertidumbre en ensayos de sólidos totales. Contribución a la Educación y la Protección Ambiental, Vol. 5, 47 A, 2004.

¿BUSCA PUBLICIDAD?



La Revista CENIC Ciencias Biológicas le puede ayudar eficazmente a difundir su mensaje, así como a viabilizar sus contactos y propiciar intercambios y relaciones futuras con la comunidad científica nacional e internacional y sus instituciones respectivas.

Aproveche esta oportunidad que a módicos precios le ofrece para que su mensaje viaje y llegue con ella, a su círculo especializado de lectores.

TARIFAS (USD)

\$200	\$100	\$70	\$120	\$50	\$150	\$300	\$350
P	1/2P	1/3P	2/3P	1/4P	3/4P	2P	2P CENTRALES
\$850				\$500			
CONTRACUBIERTA (cuatricomía)				REVERSO DE CUBIERTA O DE CONTRACUBIERTA (cuatricomía)			

La contratación por un año (tres números) de este servicio, le proporciona como beneficio adicional, un descuento del 15 %.

Dirija su solicitud a:

Editorial CENIC

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.