

Proyecto de acreditación de métodos cuantitativos y cualitativos en el Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos del CEQIATEC bajo la norma ISO/IEC 17025

Andrea Quesada-González

Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos
Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica
✉ andquesada@itcr.ac.cr

Fecha de recepción: 4 de diciembre del 2025 | Fecha de aprobación: 5 de mayo del 2026

Resumen

La acreditación de métodos de ensayo microbiológicos en laboratorios de microbiología de alimentos y aguas es un requisito fundamental para garantizar la confiabilidad, comparabilidad y trazabilidad de los resultados analíticos. Este trabajo describe y evidencia el proceso de acreditación de métodos microbiológicos cualitativos y cuantitativos implementados en el Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos del CEQIATEC bajo la norma ISO/IEC 17025:2017. El laboratorio evaluó métodos normalizados con reconocimiento internacional como métodos alternativos rápidos, seleccionando aquellos más adecuados para su aplicación rutinaria en matrices alimentarias complejas. La implementación de estos métodos aunado a su validación y verificación permitió la acreditación de todos los ensayos ante el Ente Costarricense de Acreditación (ECA) contribuyendo al cumplimiento de metas institucionales del TEC dentro del Plan Estratégico Institucional 2022-2026 (meta 5.2.8 Acreditar pruebas de laboratorio).

Palabras clave: verificación, métodos microbiológicos, microbiología de alimentos, normas ISO, sistema de calidad

Abstract

The accreditation of microbiological testing methods in food and water microbiology laboratories is a fundamental requirement to ensure the reliability, comparability, and traceability of analytical results. This study describes and documents the accreditation process of qualitative and quantitative microbiological methods implemented at the Water and Food Microbiology Laboratory of CEQIATEC under the ISO/IEC 17025:2017 standard. The laboratory evaluated internationally recognized standardized methods as well as rapid alternative methods, selecting those most suitable for routine application in complex food matrices. The implementation, validation, and verification of these methods enabled the accreditation of all tests before the Costa Rican Accreditation Body (ECA), contributing to the achievement of institutional goals of the Costa Rica Institute of Technology (TEC) within its Institutional Strategic Plan (Goal 5.2.8: Accreditation of laboratory tests).

Keywords: accreditation, verification, microbiological methods, food microbiology, ISO/IEC 17025

Introducción

Los laboratorios de microbiología de alimentos y aguas se encargan de evaluar diferentes matrices, entre ellas, agua superficial, agua subterránea, materias primas para la elaboración de alimentos y productos terminados. Su objetivo principal es determinar si esas matrices son aptas para el consumo humano y, además, cuantificar y confirmar la presencia de microorganismos que pueden causar deterioro del alimento.

Para lograr ese objetivo, se recurre a normas nacionales e internacionales establecidas por instituciones como la Organización Internacional de Normalización (por sus siglas en inglés ISO). Específicamente, la norma internacional ISO/IEC 17025:2017 establece los requisitos para asegurar el funcionamiento uniforme de los laboratorios de ensayo, proporciona el marco internacional para asegurar la competencia técnica y la imparcialidad de estos, establece requisitos específicos para la gestión de la calidad en los procesos analíticos y promueve la confianza tanto a nivel nacional como internacional [1].

El Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos que forma parte del Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC) (Figura 1) de la Escuela de Química del Instituto Tecnológico de Costa Rica presta servicios de ensayos acreditados bajo la norma ISO/IEC 17025 ante el Ente Costarricense de Acreditación (ECA).



Figura 1. Instalaciones del Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos CEQIATEC. Fuente: CEQIATEC.

En el año 2019, el laboratorio estableció como prioridad la verificación de nuevos servicios para ofrecer ensayos modernos, normalizados con mayor sensibilidad y especificidad y que, además, permiten reducir tiempos de respuesta, por lo que definió las condiciones operativas óptimas (temperatura, tiempo de incubación, medios selectivos) y estableció como objetivo su acreditación ante el ECA para garantizar la confiabilidad y trazabilidad de los resultados microbiológicos y ofrecer así un servicio de calidad a la comunidad costarricense.

Verificación de métodos microbiológicos

En microbiología, se realizan ensayos que se clasifican en dos grandes grupos: cualitativos y cuantitativos. El laboratorio seleccionó métodos de ambos tipos en su última versión vigente y se inició el proceso de verificación siguiendo los criterios regulatorios internacionales que establecen directrices claras para verificarlas.

Y en un contexto donde la inocuidad alimentaria y la calidad del agua son pilares para la salud pública, el laboratorio debió demostrar que sus métodos poseen los siguientes parámetros críticos: precisión, exactitud, sensibilidad, especificidad, selectividad, reproducibilidad y robustez adecuadas, asegurando que los métodos ofrecen resultados consistentes entre analistas, laboratorios y lotes de reactivos.

Asimismo, la norma requiere evidencia documental exhaustiva y trazabilidad metrológica; por lo que el laboratorio redactó protocolos y procedimientos detallados, registros de calibración y mantenimiento de equipos críticos, control de calidad de medios de cultivo, controles positivos, controles negativos y controles de ambiente y esterilidad de los medios de cultivo empleados. En este sentido, la gestión documental y el aseguramiento de la calidad son fundamentales en la tareas administrativas y operativas.

Capacitación del personal

La capacitación del personal es un pilar fundamental para la norma ISO 17025:2017, dado que el desempeño analítico depende en gran medida de la competencia técnica y del recurso humano. La interpretación correcta de los requisitos normativos, junto con la ejecución precisa de procedimientos microbiológicos exigió formación especializada y la evaluación de la competencia. El CEQIATEC organizó capacitaciones magistrales, actividades evaluativas teóricas y testificación del proceso de montaje de los ensayos por parte de los participantes (personal técnico).

Microbiología cualitativa

Estos corresponden a la detección de microorganismos patógenos, *Salmonella* spp. método AOAC 061203 y *Listeria monocytogenes* método AOAC 061506, ambos mediante "Amplified Nucleic Single Temperature Reaction" (ANSR) (figura 2) que consiste en una única reacción de amplificación isotérmica. La verificación se realizó siguiendo lo indicado en la norma ISO 16140-2:2016 que establece los protocolos para la verificación de métodos alternativos frente a métodos de referencia [2], lo que garantiza que estos sean específicos, reproducibles y aptos para su propósito.

La verificación de estos métodos se realizó usando diferentes matrices de alimentos, se incluyeron aquellas que podían causar interferencias como legumbres, cárnicos y lácteos. Los parámetros que se incluyeron en este proceso fueron: sensibilidad, especificidad, selectividad, falsos positivos, falsos negativos y se calculó el límite de detección [3].

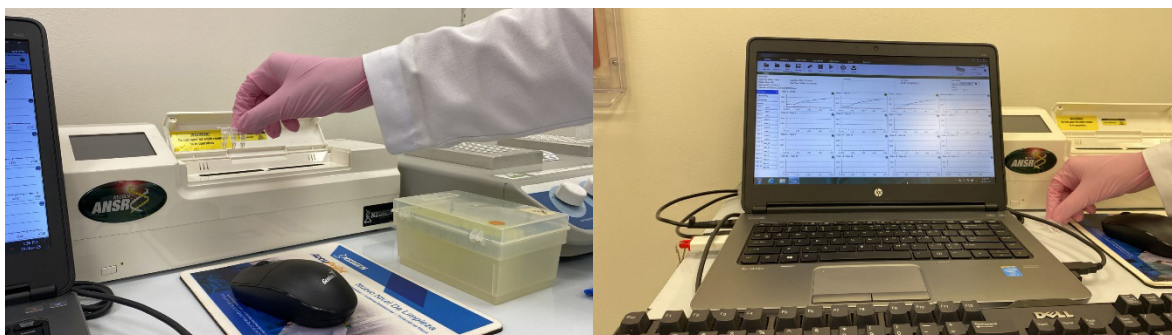


Figura 2. Equipo "Amplified Nucleic Single Temperature Reaction" (ANSR). Fuente: CEQIATEC.

Los resultados generados fueron reportados como positivos y negativos, por lo que no se realizaron cálculos estadísticos ni se consideró incertidumbre (grado de duda que existe sobre qué tan preciso o confiable es un resultado obtenido); solamente se describieron las fuentes de incertidumbre habituales (personal, equipo, condiciones ambientales, medios de cultivo, matriz y recolección de muestras).

En el proceso se usaron cepas bacterianas control como *Salmonella* ATCC 7001, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 25922.

Microbiología cuantitativa

La verificación implicó evaluar parámetros como precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad, límite de cuantificación y robustez [4] a los métodos recuento mesófilo aerobio AOAC 990.12 y AOAC 986.33., recuento de hongos y levaduras AOAC 997.02, recuento de coliformes totales y *Escherichia coli* AOAC 991.14 y ATCC 998.08, recuento de *Staphylococcus aureus* AOAC 2003.7, ATCC 2003.8 y ATCC 2003.11 y recuento de bacterias lácticas AOAC 041701, se usaron diferentes matrices de alimentos incluyendo aquellas que podían causar interferencias como legumbres, cárnicos y lácteos.

Uno de los principales retos consistió en calcular y controlar la incertidumbre de la medición, ya que, a diferencia de métodos fisicoquímicos, la estimación de incertidumbre en microbiología requiere abordar la variabilidad inherente al crecimiento microbiano, así como, la heterogeneidad en las muestras y los procedimientos de cultivo y recuento.



Figura 3. Cepas bacterianas usadas en las pruebas de laboratorio.

Se describieron las fuentes de incertidumbre que pueden afectar los resultados (personal, equipo, condiciones ambientales, medios de cultivo, matriz y recolección de muestras) y se calculó la Desviación Estándar de Reproducibilidad (RSDR); con este dato se calculó la reproducibilidad combinada (RSDrc) y se utilizó finalmente la ecuación $UM = \text{Log}(c) \pm k \cdot \text{RSDrc}$ con un factor de cobertura de 2 [5], estos cálculos permiten determinar el intervalo en el cual el resultado obtenido es considerado válido, confiable y cercano al valor real.

La verificación se realizó según lo indicado en la norma ISO 16140-2:2016 y se usaron cepas bacterianas control *Escherichia coli* ATCC 25922 (Figura 3), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Lactobacillus casei* ATCC 0334, *Enterococcus faecalis* ATCC 14506 y la levadura *Candida albicans* ATCC 90028.

Desafíos técnicos en un proceso para acreditación

La primera dificultad radica en la variabilidad biológica y ambiental de los microorganismos. A diferencia de los métodos fisicoquímicos, los sistemas vivos responden de forma distinta ante factores como temperatura, pH, nutrientes, inhibidores o estrés ambiental. Esto generó desafíos en la estandarización de cultivos, recuperación de células dañadas y mantenimiento de viabilidad microbiana durante ensayos comparativos.

Otro reto importante fue la complejidad de las matrices de alimentos, pues los lácteos, cárnicos, frutas y legumbres contienen compuestos que pueden inhibir o potenciar el crecimiento microbiano, afectando la recuperación y cuantificación. La presencia de sólidos grasas, proteínas, carbohidratos y sustancias antimicrobianas requiere controles adicionales, diluciones correctas y métodos de neutralización adecuados para evitar sesgos analíticos.

La disponibilidad de materiales de referencia y cultivos certificados fue otro factor crítico. Para garantizar trazabilidad metrológica, el laboratorio trabajó con cepas certificadas American Type Culture Collection (ATCC), estos insumos representan altos costos y tiempos de importación prolongados por parte de proveedores, generando barreras logísticas y económicas.

La incertidumbre analítica y la repetibilidad entre analistas y equipos representaron otro desafío. La cuantificación microbiológica tradicional (UFC/g) implica variaciones inherentes al recuento, diluciones seriadas, lectura de resultados y condiciones de incubación. Por ello, el laboratorio implementó protocolos estrictos de capacitación, verificación entre personas analistas, así como, mantenimiento y calibración de equipos considerados críticos.

Otro desafío fue incluir la recolección de las muestras, considerada una variable pre-analítica que puede afectar los resultados si no se controla, el laboratorio debió asegurar la técnica aséptica durante la manipulación, la temperatura y condiciones de transporte, así como, el tiempo máximo de almacenamiento y condiciones previo al ensayo, es decir, todas las disposiciones necesarias para proteger la integridad y los intereses del laboratorio.

Finalmente, la adopción de nuevas tecnologías, como métodos rápidos, exige validaciones equivalentes a métodos tradicionales. La comparación metodológica y la demostración de equivalencia estadística demandan experiencia estadística y recursos técnicos.

Proceso de acreditación

Finalizada la verificación técnica de las metodologías y la puesta a punto en el laboratorio, CEQIATEC procedió a solicitar una evaluación al Ente Costarricense de Acreditación y recibió expertos técnicos en microbiología y evaluadores líder para la evaluación de la conformidad, la acreditación se brinda por 4 años y debe ser evaluada durante ese periodo y posterior para mantenerla.

El laboratorio demostró la idoneidad de los métodos elegidos y analizados, considerando el tipo de muestra, el rango de microorganismos a detectar y las condiciones operativas del laboratorio.

Una vez finalizado el proceso de evaluación el ECA aprobó la ampliación del alcance en los siguientes métodos: recuento mesófilo aerobio AOAC 990.12 y AOAC 986.33., recuento de hongos y levaduras AOAC 997.02, recuento de coliformes totales y *Escherichia coli* AOAC 991.14 y ATCC 998.08, recuento de *Staphylococcus aureus* AOAC 2003.7, ATCC 2003.8, ATCC 2003.1, *Salmonella* spp. método AOAC 061203, *Listeria monocytogenes* método AOAC 061506 y recuento de bacterias lácticas AOAC 041701.

Conclusión

La acreditación de métodos microbiológicos en el Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos del CEQIATEC bajo la norma ISO/IEC 17025:2017 fue un proceso riguroso y desafiante, que combinó exigencias técnicas, documentales y de gestión del personal técnico, su implementación y mantenimiento requiere recursos, disciplina y un compromiso sólido con la calidad.

Esto constituye una herramienta clave para la gestión de la calidad analítica, la protección de la salud pública y la confianza en los sistemas de inocuidad. Su implementación, aunque demandante, permite al laboratorio demostrar competencia técnica, reducir incertidumbres y garantizar decisiones basadas en evidencia científica.

La implementación de estos métodos aunado a su validación y verificación permitió la acreditación de todos los ensayos ante el Ente Costarricense de Acreditación (ECA) contribuyendo al cumplimiento de metas institucionales del TEC dentro del Plan Estratégico Institucional 2022-2026 (meta 5.2.8 Acreditar pruebas de laboratorio).

Además, la implementación de los métodos racionaliza significativamente el uso de recursos, reduce la necesidad de adquirir reactivos y contribuye a la disminución en la generación de desechos, optimizando tanto costos como el impacto ambiental de la institución, no solo mejora la competencia analítica, sino que contribuye directamente a la protección de la salud pública y la seguridad alimentaria.

Referencias

- [1] ISO/IEC 17025 Testing and calibration laboratories Accedido: 25 de noviembre de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.iso.org/ISO-IEC-17025-testing-and-calibration-laboratories.html#:~:text=ISO%2FIEC%2017025%20enables%20laboratories,nationally%20and%20around%20the%20world>
- [2] International Organization for Standardization, *ISO 16140-2: Microbiology of the Food Chain—Method Validation—Part 2: Protocol for the Validation of Alternative (Proprietary) Methods Against a Reference Method*. Geneva, Switzerland: ISO, 2016.
- [3] AOAC International, *Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces*. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2012.
- [4] International Organization for Standardization, *ISO 16140-3: Microbiology of the Food Chain—Method Validation—Part 3: Verification of Reference and Validated Alternative Methods Implemented in the Laboratory*. Geneva, Switzerland: ISO, 2021.
- [5] A. Gao and P. Martos, "Log transformation and the effect on estimation, implication, and interpretation of mean and measurement uncertainty in microbial enumeration," *Journal of AOAC International*, vol. 102, no. 1, pp. 233–238, Nov. 2019, doi: 10.5740/jaoacint.18-0161.

Sobre los autores

Andrea Quesada-González

Licenciada en Microbióloga Química Clínica de la Universidad de Costa Rica, posee una maestría en Ingeniería Ambiental de UNEATLANTICO, España. Labora para Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC) desde el año 2016 como regente del Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos y también como docente en la Escuela de Química. ORCID: (<https://orcid.org/0000-0003-0163-6775>)