



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**Validación de método microbiológico cuantitativo recuento
de *E. coli* en embutidos por método rápido petrifilm**

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

Autora: Montaña Viñan, María Gabriela

Directora: Hualpa Salinas, Diana Inés

LOJA

2025



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2025

Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular

Loja, 13 de Marzo de 2025

Bioquímica Farmacéutica

Claudia Tereza Cruz Erazo

Directora de la la carrera de Bioquímica y Farmacia

Ciudad.-

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Integración Curricular denominado: "Validación de método microbiológico cuantitativo recuento de *E. coli* en embutidos por método rápido petrifilm" realizado por Maria Gabriela Montaña Viñan ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Directora: Diana Inés Hualpa Salinas, Magíster

C.I.: 1102806062

Correo electrónico: dihualpa@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Maria Gabriela Montaña Viña, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autora del Trabajo de Integración Curricular denominado: “Validación de método microbiológico cuantitativo recuento de *E. coli* en embutidos por método rápido petrifilm”, de la carrera de bioquímica y farmacia, específicamente de los contenidos comprendidos en: primero capítulo tenemos marco teórico, segundo capítulo objetivos, tercer capítulo materiales y métodos y como cuarto capítulo planteamos resultados y discusiones, directora del presente trabajo la Mgts. Diana Inés Hualpa Salinas del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”, en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....

Autora: Maria Gabriela Montaña Viñan

C.I.: 1900693530

Correo electrónico: mgmontano1@utpl.edu.ec

Dedicatoria

Dedico mi trabajo a mis queridos padres, Martha Elena Viñán Torres y Jesús Montaña Espinoza, les debo todo mi amor y respeto. Su amor incondicional y sus sacrificios me han enseñado el verdadero significado del esfuerzo.

A mis hermanos, Ramiro Alejandro, Karla Yadyra y Carlos Eduardo Montaña Viñán, gracias por estar siempre a mi lado, apoyándome y motivándome en cada paso de este camino.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento. Este logro es el reflejo del esfuerzo y compromiso conjunto de cada uno de ustedes, quienes han sido fundamentales en mi camino.

Agradecimiento

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Dios, por otorgarme la sabiduría, la fortaleza y la perseverancia que necesitaba para alcanzar este logro.

A mis padres, por día a día apoyarme con sus palabras de aliento y ser mi guía en todo este transcurso de tiempo.

A mi amiga Nathaly Stephania Escobar Armijos, has sido un pilar fundamental en los momentos de incertidumbre, brindándome tu confianza, apoyo y aliento cuando más lo necesitaba.

A mi prima Yaire Yael Camacho Viñan, gracias por tu presencia constante y tus palabras de aliento. Tus gestos me han impulsado a seguir adelante incluso en los momentos más difíciles.

Y, por supuesto, a mi docente tutor Mgtr. Diana Hualpa quien ha compartido su conocimiento conmigo. Su paciencia y dedicación en cada etapa de este proceso han sido esenciales. A la Ing. Maria Antonia Soto Granda, sin su apoyo académico y profesional, este trabajo no habría sido posible.

También quiero expresar mi agradecimiento a la Universidad Técnica Particular de Loja, por brindarme una formación académica de calidad, rodeado de grandes profesionales que han contribuido a mi crecimiento personal y profesional.

Índice de contenido

Carátula	I
Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria	V
Agradecimiento.....	VI
Índice de contenid.....	VII
Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo uno.....	5
Marco teórico	5
1.1 Validación de métodos microbiológicos	5
1.2 Métodos de validación.....	5
1.2.2 Métodos alternativos al método de referencia (tipo II)	5
1.2.3 Métodos normalizados con modificaciones o basados en métodos de referencia (tipo III).....	6
1.2.4 Otros métodos (tipo IV)	6
1.3 Parámetros de validación	6
1.3.1 Reproducibilidad.....	6
1.3.2 Repetibilidad.....	6
1.4 Cepa de referencia	7
1.4.1 <i>Escherichia coli</i>	7
1.5 Enfermedades transmitidas por alimentos (eta).....	7
1.5.1 <i>Escherichia coli</i> en alimentos	7
Capítulo dos	8
Objetivos	8

2.1 General	8
2.2 Específico	8
Capítulo tres	9
Materiales y métodos	9
3.1 Preparación del material	9
3.2 Reconstitución de la cepa de referencia	9
Capítulo cuatro	14
Resultados y discusiones	14
4.1 Resultados experimentales	14
4.1.2 <i>Datos primarios</i>	14
4.1.3 <i>Precisión</i>	16
4.1.4 <i>Precisión de los tres niveles</i>	19
4.1.5 <i>Concentración mínima de resumen de Escherichia coli</i>	20
4.1.6 <i>Test crítico y test calculado</i>	20
4.1.7 <i>Exactitud</i>	21
4.1.8 <i>Contribución de incertidumbre</i>	23
4.2 Discusión	23
4.2.2 <i>Precisión y reproducibilidad</i>	24
4.2.3 <i>Límite de cuantificación</i>	24
4.2.4 <i>Exactitud</i>	25
4.2.5 <i>Incertidumbre</i>	25
4.2.6 <i>Aplicación en la industria alimentaria</i>	26
Conclusiones	27
Recomendaciones	28
Referencias	29
Apéndice	33
Apéndice A. Elaboración de agar soya tripticasa	33
Apéndice B. Obtención de agua buferada esteril	33

Apéndice C. Elaboración de caldo de soya tripticasa (TSB).....	33
Apéndice D. Método microbiológico cuantitativo para el recuento de <i>Escherichia coli</i> en embutidos.....	33

Índice de tablas

Tabla 1 Nivel I (10 - 100)	14
Tabla 2 Nivel II (100 - 1000).....	15
Tabla 3 Nivel III (1000 - 10000).....	15
Tabla 4 ANOVA para el nivel I (10 - 100).....	16
Tabla 5 ANOVA para el nivel II (100 - 1000)	17
Tabla 6 ANOVA para el nivel III (1000 - 10000)	18
Tabla 7 Desviación de reproductividad y repetibilidad para nivel I, II y III.....	19
Tabla 8 Datos primarios de repetibilidad – efecto matricial	19
Tabla 9 Análisis de varianza de repetibilidad – efecto matricial.....	19
Tabla 10 Límite de cuantificación	20
Tabla 11 Test de valor crítico y test calculado de repetibilidad	20
Tabla 12 Nivel I	21
Tabla 13 Nivel II	22
Tabla 14 Nivel III.....	22
Tabla 15 Incertidumbre para nivel I, nivel II y nivel III	23

Índice de figuras

Figura 1 Preparación del material.....	9
Figura 2 Metodología AOAC 991.14.....	10

Resumen

Este trabajo valida el método microbiológico rápido Petrifilm para cuantificar *Escherichia coli* en embutidos, analizando parámetros como precisión, exactitud, repetibilidad, límite de cuantificación e incertidumbre. Para realizar la validación, se empleó el método AOAC 991.14 del, que emplea la metodología del recuento directo en placa para *E.coli*, utilizando la cepa de referencia de la ATCC #11775, la población bacteriana se ajustó a diferentes niveles de concentración (Nivel I, II y III) con ayuda de un densitómetro. Los resultados muestran que los valores de los parámetros de validación, se encuentran dentro de rangos aceptables de acuerdo a la Guía Eurachem, de esta manera se comprueba que los resultados son confiables. El método por Petrifilm representa una alternativa eficiente para el control de calidad, contribuyendo así a la seguridad alimentaria. Su implementación puede ser especialmente valiosa en un entorno donde la rapidez y precisión son cruciales para garantizar productos seguros para el consumo.

Palabras clave: Petrifilm, *Escherichia coli*, validación.

Abstract

This work validates the Petrifilm rapid microbiological method for quantifying *Escherichia coli* in sausages, analyzing parameters such as precision, accuracy, repeatability, quantification limit and uncertainty. To perform the validation, the AOAC 991.14 method was used, which employs the direct plate count methodology for *E. coli*, using the ATCC reference strain #11775. The bacterial population was adjusted to different concentration levels (Level I, II and III) with the help of a densitometer. The results show that the values of the validation parameters are within acceptable ranges according to the Eurachem Guide, thus proving that the results are reliable. The Petrifilm method represents an efficient alternative for quality control, thus contributing to food safety. Its implementation can be especially valuable in an environment where speed and precision are crucial to guarantee safe products for consumption.

Keywords: Petrifilm, *Escherichia coli*, microbiology, validation.

Introducción

Este proyecto se basa en la validación del método microbiológico cuantitativo, el cual es un proceso importante para la implementación de la técnica analítica microbiológica, pues se logró establecer de forma experimental que las características de su desempeño cumplen con los requisitos para la aplicación prevista. Para ello se tomó en cuenta los siguientes parámetros, sensibilidad, especificidad, precisión, veracidad, reproducibilidad y robustez (Arias, 2013).

Para el presente proyecto de fin de titulación, se planteó validar el método rápido petrifilm para la cuantificación de coliformes y *Escherichia coli* con el método oficial AOAC 991.14, se utilizó la cepa de referencia ATCC # 11775 de la colección American Type Culture Collection, en embutidos. Este método es ampliamente reconocido en la industria alimentaria debido a su facilidad para llevar a cabo controles microbiológicos, lo que simplifica considerablemente las dificultades asociadas al análisis microbiológico de los alimentos (Figueroa et al., 2015).

Los embutidos son productos de venta libre, los cuales tienen gran aceptación por sus atributos organolépticos y practicidad de consumo, no obstante, la naturaleza y producción de los embutidos son vulnerables a la contaminación con microorganismos que ocasionan su deterioro, así como por patógenos asociados a enfermedades transmitidas por los alimentos (Jiménez-Edeza et al., 2020).

El grupo coliforme (*Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*) son utilizados con frecuencia como indicador bacteriano de la calidad sanitaria de los alimentos y el agua, estas son bacterias gramnegativas, con forma de bastón, no formadoras de esporas, que pueden fermentar la lactosa con producción de ácido y gas cuando se las incubaba a 35–37°C. Los coliformes pueden encontrarse en ambientes acuáticos, suelo y vegetación; además de estar presentes en grandes cantidades en las heces de los animales de sangre caliente (Coliformes, 2021).

Escherichia coli es una bacteria gram negativa que forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal, es el organismo aislado con mayor frecuencia en el laboratorio clínico

ya que es un patógeno entérico importante, especialmente en los países en desarrollo. Los principales grupos de este organismo responsable de la enfermedad entérica incluyen los serotipos enteropatógenos clásicos (EPEC), enterotoxigénicos (ETEC), enteroinvasivos (EIEC), enterohemorrágicos (EHEC) y enterogregativos (EAEC). Durante el proceso de elaboración y empaque del embutido, se deben llevar controles en cada etapa para evitar contaminaciones en el alimento y por tanto cumpla su estado inocuo hasta su expiración.

En el primer capítulo: se abordan temas como validación de métodos microbiológicos, métodos de validación, parámetros de validación, cepa de referencia y enfermedades transmitidas por alimentos. En el segundo capítulo se refiere a los objetivos generales y específicos. En el tercer capítulo se especifica la preparación del material, reconstitución de la cepa de referencia, metodología AOAC, repetibilidad y preparación de niveles para validación del método. En el cuarto capítulo se relata los resultados representados en tablas y figuras, también se encuentran las discusiones conclusiones y recomendaciones.

Este trabajo de titulación tiene como objetivo contribuir a la confiabilidad, confidencialidad, exactitud y precisión de resultados de los Laboratorios UTPL, en cuanto a pruebas microbiológicas en alimentos.

Capítulo uno

Marco teórico

1.1 Validación de métodos microbiológicos

La validación de métodos se puede conceptualizar como el conjunto de procedimientos llevados a cabo para "confirmar mediante evaluación y proporcionar pruebas objetivas que demuestren el cumplimiento de requisitos específicos destinados al uso previsto de los procedimientos analíticos" (Rabenau, 2007).

La validación de técnicas microbiológicas debe reflejar las condiciones reales de prueba. Esto se logra empleando muestras contaminadas de forma natural o muestras contaminadas que han sido fortificadas a un nivel específico. En líneas generales, el procedimiento implica la creación de una muestra mediante la adición de material interferente a una muestra real que contenga el material a analizar. Posteriormente, se diluye una segunda porción de la muestra original con un solvente, y ambas muestras se analizan para determinar la discrepancia entre ellas (Camaró et al., 2015).

1.2 Métodos de validación

Es relevante abordar la descripción de las categorías de métodos de acuerdo con las pautas establecidas por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), las cuales clasifican dichos métodos como tipo I, II, III y IV, cada una con requisitos de validación específicos.

1.1.1 Métodos normalizados (tipo I)

Procedimiento de prueba estandarizado que se emplea de manera precisa conforme a lo especificado en la normativa correspondiente (Artedínamico, 2022).

1.2.2 Métodos alternativos al método de referencia (tipo II)

Los métodos desarrollados por los fabricantes de equipos son comúnmente clasificados en esta categoría. El laboratorio debe contar con pruebas que respalden la validación del método, y, para propósitos de validación, se considerarán equivalentes a los métodos de referencia (Camaró et al., 2015).

1.2.3 Métodos normalizados con modificaciones o basados en métodos de referencia (tipo III)

Procedimiento de prueba normalizado modificado, el cual no se ejecuta de manera exacta según la descripción en la normativa, debido a expansiones y/o modificaciones en el alcance del método normalizado (Artedínamico, 2022).

1.2.4 Otros métodos (tipo IV)

Estos métodos son aquellos desarrollados por el propio laboratorio o por cualquier otra entidad, como un fabricante o proveedor, que no cuentan con la aprobación formal como métodos de referencia o alternativos. La validación de tales métodos debe ser exhaustiva y adaptarse según sea necesario para cumplir con los requisitos específicos de la aplicación o el campo de aplicación correspondiente (Camaró et al., 2015).

1.3 Parámetros de validación

1.3.1 Reproducibilidad

La proximidad de la concordancia entre resultados individuales en un material de prueba idéntico, utilizando el mismo método y realizado por operadores en equipos diferentes se conoce como reproducibilidad. El límite de reproducibilidad (R) establece el valor más bajo o igual en el cual se espera que la diferencia absoluta entre los resultados obtenidos bajo condiciones reproducibles tenga una probabilidad del 95%. Si la diferencia entre los resultados de dos laboratorios diferentes supera el valor de R, se consideran sospechosos (Ortega et al., 2013).

1.3.2 Repetibilidad

La proximidad de resultados independientes obtenidos mediante el mismo método, utilizando un material de prueba idéntico y en las mismas condiciones (equipo, operador, laboratorio y a cortos intervalos de tiempo, es decir, condiciones de repetibilidad) se denomina repetibilidad. El límite de repetibilidad (r) representa el valor más bajo o igual en el cual se espera que la diferencia absoluta, obtenida bajo condiciones de repetibilidad, tenga una probabilidad del 95%. Si la diferencia entre los dos resultados excede el valor de (r), se considera que los resultados son sospechosos (Ortega et al., 2013).

1.4 Cepa de referencia

1.4.1 *Escherichia coli*

Para el desarrollo de la investigación se empleó la cepa *Escherichia coli* de la colección American Type Culture Collection ATCC # 11775 con el método oficial AOAC 991.14.

1.5 Enfermedades transmitidas por alimentos (eta)

1.5.1 *Escherichia coli* en alimentos

E. coli es una bacteria que se encuentra en los intestinos de personas y animales, así como en el medio ambiente, los alimentos y el agua contaminada. La mayoría de los tipos de *E. coli* son inofensivos, pero algunos pueden causar enfermedades graves, como diarrea, infecciones urinarias y del torrente sanguíneo. Las personas más vulnerables a la infección son adultos mayores, niños menores de 5 años, personas con sistemas inmunológicos debilitados y aquellos que viajan a ciertos países. Los síntomas comunes incluyen diarrea, cólicos estomacales y, en casos graves, el síndrome urémico hemolítico. Es importante buscar atención médica si los síntomas persisten o empeoran. Se recomienda practicar una buena higiene y tomar precauciones al manipular alimentos y agua para prevenir la infección por *E. coli* (Centers for Disease Control and Prevention, 2023).

Capítulo dos

Objetivos

2.1 General

Contribuir a la confiabilidad, confidencialidad, exactitud y precisión de resultados de los Laboratorios UTPL, en cuanto a pruebas microbiológicas en alimentos.

2.2 Específico

Implementar método de recuento de *Escherichia coli*.

Validar, método de recuento de *Escherichia coli*.

glicerol, posteriormente se transfirió una azada a un tubo inclinado de agar nutriente de la marca DIFCO TM. Este procedimiento se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar para tener un ambiente libre de contaminación. Posteriormente se llevó a incubación a una temperatura de 37°C por un tiempo de 24 horas.

3.3 Metodología AOAC

Se realizó mediante el método oficial de AOAC 991.14, recuento de *Escherichia coli* en alimentos por método rápido en placas petrifilm.

Se prepararon las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , luego se levantó la película superior y se inoculó la suspensión de prueba de 1 ml en el centro de la base de la película. Se colocó con cuidado la película superior sobre el inoculó. Una vez hidrata y solidificada se incubó las placas durante 24 ± 2 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

En la incubadora, se colocó las placas en posición horizontal, con el lado claro hacia arriba, en pilas que no excedieron de 20 unidades. Se utilizó el contador de colonias estándar para fines de conteo.

Recuento de *E. coli*. se observó como colonias azules asociadas con burbujas de gas.

Figura 2

Metodología AOAC 991.14



Nota. Metodología empleada en general.

3.4 Repetibilidad

Para realizar la validación de este parámetro, se trabajó con embutidos, el cual fue adquirido en el mercado de la ciudad de Loja. Las muestras seccionadas fueron almacenadas en refrigeración a 2°C. Para la dilución 10^{-1} se pesó 10 g de embutido de la muestra original (sin tratamiento), se colocó en un boeco tapa tipo rosca de 100 ml con 90 ml de agua peptonada bufferada, se homogenizó para que se distribuya uniformemente la muestra, se extrajo 1ml de la dilución 10^{-1} para colocar en la placa de *E. coli*. se levantó la película superior e inoculó 1 ml de la dilución 10^{-1} se colocó con cuidado la película superior sobre el inoculó, las placas fueron incubadas durante 24 ± 2 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Todo esto se realizó en la cámara de flujo laminar. Los datos obtenidos fueron utilizados para calcular el parámetro de repetibilidad durante un período de 3 semanas y 2 días, con un total de 21 repeticiones.

3.5 Preparación de niveles de concentración para validación de método

Se evaluó la turbidez de la población bacteriana de una cepa de referencia, ajustándola a tres niveles de concentración: bajo (0.5 NTU), medio (1 NTU) y alto (2 NTU). Para ello, utilizamos un tubo de vidrio con tapa rosca que contenía 3 ml de caldo nutriente. Cada uno de estos niveles de concentración se asoció con un rango específico de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo:

Bajo / Primer nivel: 10 – 100 UFC/g

Medio / Segundo nivel: 100 – 1000 UFC/g

Alto / Tercer nivel: 1000 – 10000 UFC/g

A continuación, se detalla el procedimiento de siembra, incluyendo el peso de la muestra utilizado para cada dilución.

Para el tercer nivel, se preparó la dilución 10^{-1} se utilizó un boeco tapa tipo rosca de 200 ml, se colocó 25 g de muestra de embutido (tratado previamente con luz ultravioleta durante 20 min), en 225 ml de agua peptonada bufferada, con ayuda del equipo densitómetro se midió la escala de turbidez 0.5 McFarland con la cepa previamente reconstituida en un tubo tapa tipo rosca con 3 ml de caldo nutriente, se transfirió 50 μl a la dilución 10^{-1} se agitó varias veces, se extrajo 1ml de la dilución 10^{-1} y se trasfirió en un tubo tapa tipo rosca de 20

ml que contenía 9 ml de agua peptonada bufferada estéril, se colocó en el agitador (vortex) durante 10 segundos para homogeneizar la dilución, en la placa de *E. coli*. se levantó la película superior e inoculo 1 ml de la dilución 10^{-2} se colocó con cuidado la película superior sobre el inoculo, ya la placa hidratada y solidificada se incubo las placas durante 24 ± 2 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Todo esto se realizó en la cámara de flujo laminar.

Para el segundo nivel, se preparó la dilución 10^{-1} se utilizó un boeco tapa tipo rosca de 200 ml, se colocó 25 g de muestra de embutido (tratado previamente con luz ultravioleta durante 20 min), en 225 ml de agua peptonada bufferada, con ayuda del equipo densitómetro se midió la escala de turbidez 0.5 McFarland con la cepa previamente reconstituida en un tubo tapa tipo rosca con 3 ml de caldo nutriente, se transfirió 20 μl a la dilución 10^{-1} se agitó varias veces, se extrajo 1ml de la dilución 10^{-1} y se trasfirió en un tubo tapa tipo rosca de 20 ml que contenía 9 ml de agua peptonada bufferada estéril, se colocó en el agitador durante 10 segundos para homogeneizar la dilución, en la placa de *E. coli*. se levantó la película superior e inoculo 1 ml de la dilución 10^{-2} se colocó con cuidado la película superior sobre el inoculo, ya la placa hidratada y solidificada se incubó las placas durante 24 ± 2 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Todo esto se realizó en la cámara de flujo laminar.

Para el primer nivel, se preparó la dilución 10^{-1} se utilizando un boeco tapa tipo rosca de 200 ml, se colocó 50 g de muestra de embutido (tratado previamente con luz ultravioleta durante 20 min), en 450 ml de agua peptonada bufferada, con ayuda del equipo densitómetro se midió la escala de turbidez 0.5 McFarland con la cepa previamente reconstituida en un tubo tapa tipo rosca con 3 ml de caldo nutriente, se transfirió 2 μl a la dilución 10^{-1} se agitó varias veces, se extrajo 1ml de la dilución 10^{-1} y se trasfirió en la placa de *E. coli*. se levantó la película superior e inoculo 1 ml de la dilución 10^{-2} se colocó con cuidado la película superior sobre el inoculo, ya la placa hidratada y solidificada se incubo las placas durante 24 ± 2 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Todo esto se realizó en la cámara de flujo laminar.

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) ya que el propósito de este estudio no es comparar nuestros datos con otros, sino más bien identificar diferencias significativas dentro del grupo que estamos analizando.

3.6 Fórmulas para la validación de parámetros

Precisión	$SDC_B = \sum_{i=1}^5 p(x_i - \bar{x})^2$	$SDC_W = \sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^3 (x_i - \bar{x})^2$	$DCM_B = \frac{SDC_B}{3-1}$	$DCM_W = \frac{SDC_W}{21-3}$
	$S_r = \sqrt{DCM_W}$	$S^2_L = \frac{DCM_B - DCM_W}{7}$	$S_R = \sqrt{S^2_r - S^2_L}$	
Test calculado y test critico	$t_{calc} = \frac{ \bar{x} - \mu }{\frac{S}{\sqrt{n}}}$			
Límite de cuantificación	$LQF = 10xDSV$			
Exactitud	$(R) = \frac{VV}{VR} \times 100$			
Incertidumbre	$\mu_{(Bal)} = \frac{U}{k}$	$\mu_{(resol)} = \frac{Resolución}{\sqrt{3}}$	$\mu_{(Balanza)} = \sqrt{\mu_{(Bal)}^2 + \mu_{(resol)}^2}$	
	$U_{rep} = \frac{S}{\sqrt{n}}$	$U_{Expandida} = 2 * U_{color}$		

Capítulo cuatro

Resultados y discusiones

4.1 Resultados experimentales

4.1.2 Datos primarios

Se analizaron y organizaron los datos mediante el análisis de varianza (ANOVA), a continuación se presentan tablas, las cuales contienen información tabulada referente a la evaluación de la precisión, exactitud y variabilidad del método microbiológico cuantitativo aplicado, considerando distintas concentraciones de *E.coli* en UFC/g

Los datos recolectados, se organizaron en tablas de tres niveles de concentración de UFC/g de *E. coli* evaluados mediante el método rápido Petrifilm. A continuación, se presentan las tablas correspondientes a cada nivel, con una descripción de los datos y su relevancia para el análisis.

De acuerdo al método microbiológico cuantitativo, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 1

Nivel I (10 - 100)

NIVEL I					
UFC/g	Log10	UFC/	Log10	UFC/	Log10
	UFC/g	g	UFC/g	g	0 UFC/g
20	1,30	50	1,70	60	1,78
30	1,48	50	1,70	30	1,48
10	1,00	10	1,00	10	1,00
20	1,30	20	1,30	30	1,48
10	1,00	30	1,48	20	1,30
40	1,60	30	1,48	10	1,00
10	1,00	10	1,00	10	1,00

Nota. Resume las concentraciones evaluadas (UFC/g) y sus valores logarítmicos (Log10 UFC/g) en el primer nivel para la cepa *E. coli*.

Este rango, con concentraciones bajas, muestra una variabilidad considerable entre los datos. Los valores logarítmicos oscilan entre 1,00 (10 UFC/g) y 1,78 (60 UFC/g). Esta

dispersión inicial sugiere mayor sensibilidad del método en niveles bajos de concentración, lo que podría generar incertidumbre.

Tabla 2

Nivel II (100 - 1000)

NIVEL II						
UFC/g	Log10	UFC/	Log10	UFC/	Log1	
UFC/g	g	UFC/g	g	0 UFC/g		
800	2,90	500	2,70	500		2,70
300	2,48	600	2,78	600		2,78
500	2,70	900	2,95	900		2,95
600	2,78	600	2,78	400		2,60
600	2,78	100	2,00	500		2,70
500	2,70	1000	3,00	500		2,70
600	2,78	500	2,70	500		2,70

Nota. Resume las concentraciones evaluadas (UFC/g) y sus valores logarítmicos (Log10 UFC/g) en el segundo nivel para la cepa E. coli.

En este rango intermedio, los valores logarítmicos presentan mayor uniformidad, con una tendencia más estable entre 2,00 y 3,00. Esto indica un mejor control del método en esta fase.

Tabla 3

Nivel III (1000 - 10000)

NIVEL III						
UFC/g	Log10	UFC/	Log10	UFC/	Log1	
UFC/g	g	UFC/g	g	0 UFC/g		
9300	3,97	3300	3,52	1100		3,04
8000	3,90	3600	3,56	1100		3,04
2100	3,32	1200	3,08	1000		3,00
2200	3,34	1700	3,23	1300		3,11
1700	3,23	3500	3,54	1300		3,11
1800	3,26	3200	3,51	1200		3,08
2500	3,40	1000	3,00	1400		3,15

Nota. Resume las concentraciones evaluadas (UFC/g) y sus valores logarítmicos (Log10 UFC/g) en el tercer nivel para la cepa E. coli.

En las concentraciones más altas, los valores logarítmicos fluctúan de manera extensa, entre 3,00 y 3,97. Este comportamiento refleja que, aunque el método es eficaz en detectar concentraciones elevadas, la dispersión podría deberse a limitaciones instrumentales o variaciones en las condiciones de incubación.

4.1.3 Precisión

El análisis de varianza para precisión, que evaluó a través de ANOVA, con parámetros de reproducibilidad y repetibilidad. A continuación, se describen los resultados de cada nivel:

Tabla 4

ANOVA para el nivel I (10 - 100)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	7	8,68	1,24	0,06		
Columna 2	7	9,65	1,38	0,09		
Columna 3	7	9,03	1,29	0,09		
Promedio			1,30			

Origen Variaciones	Suma Cuadrados	Grados libertad	Promedio Cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre Grupos	0,069	2,00	0,034	0,4	0,66	3,55
Dentro de Grupos	1,445	18,0	0,080			
Total	1,514	20,0				

Sr	S _L ²	SR	%REPRODUCIBILIDAD	%REPETIBILIDAD
0,2	-0,01	0,28	21,75%	21,75%

Nota. Esta tabla muestra los resultados de análisis de varianza, con parámetros de reproducibilidad y repetibilidad del nivel I.

La varianza entre grupos es de 0,0346, lo que indica que es baja, con un valor de F de 0,43 menor al crítico que es de 3,555. Esto indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas. Sin embargo, la reproducibilidad y repetibilidad son relativamente altas, de 21,75%, lo que refleja que los resultados tienen mayor variabilidad en concentraciones bajas.

Tabla 5

ANOVA para el nivel II (100 - 1000)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	19,11	2,73	0,02
Columna 2	7	18,91	2,70	0,11
Columna 3	7	19,13	2,73	0,01
		Promedio	2,72	

Origen Variaciones	Suma Cuadrados	Grados libertad	de Promedio Cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre Grupos	0,0043	2,00	0,0022	0,05	0,95	3,555
Dentro de Grupos	0,8324	18,00	0,0462			
Total	0,84	20,00				

Sr	SL2	SR	%REPRODUCIBILIDAD	%REPETIBILIDAD
0,22	-0,01	0,215	7,90%	7,90%

Nota. Esta tabla muestra los resultados de análisis de varianza, con parámetros de reproducibilidad y repetibilidad del nivel II.

Los resultados son más estables que en el nivel anterior. La varianza entre grupos es casi insignificante de 0,0022, y el valor F de 0,05 que permanece por debajo del crítico. La

reproducibilidad y repetibilidad se reducen notablemente a 7,90%, demostrando mayor confiabilidad en este rango.

Tabla 6

ANOVA para el nivel III (1000 - 10000)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	24,42	3,49	0,10
Columna 2	7	23,43	3,35	0,06
Columna 3	7	21,54	3,08	0,00
		Promedio	3,30	

Origen Variaciones	Suma Cuadrados	Grados libertad	de Promedio Cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre Grupos	0,61	2,00	0,31	5,88	0,01	3,56
Dentro de Grupos	0,94	18,00	0,05			
Total	1,55	20,00				

Sr	SL2	SR	%REPRODUCIBILIDAD	%REPETIBILIDAD
0,23	0,05	0,23	6,91%	6,91%

Nota. Esta tabla muestra los resultados de análisis de varianza, con parámetros de reproducibilidad y repetibilidad del nivel III.

Este nivel muestra una mayor discrepancia entre grupos, con un valor de F de 5,88, superior al crítico de 3,56. Esto apunta que, a altas concentraciones, las diferencias son significativas y requieren mayor control. A pesar de ello, la reproducibilidad y repetibilidad son las más bajas de 6,91%, lo que expresa mayor precisión en el método.

La precisión mejora con el aumento de las concentraciones, aunque en niveles altos se observa una ligera pérdida de homogeneidad entre grupos.

Tabla 7

Desviación de reproductividad y repetibilidad para nivel I, II y III

DESVIACIÓN DE REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD

NIVEL	SR	Sr	% REPRODUCIBILIDAD	% REPETIBILIDAD
I	0,28	0,28	21,75%	21,75%
II	0,22	0,22	7,90%	7,90%
III	0,23	0,23	6,91%	6,91%

Nota. Datos recolectados de los tres niveles de concentración bacteriana con respecto a la desviación estándar de reproductividad y repetibilidad.

Se observa que el nivel I presenta la mayor variabilidad (21,75%), lo que indica menor precisión en concentraciones bajas. A medida que la concentración aumenta, la variabilidad disminuye, reflejándose en menores valores para el nivel II (7,90%) y el nivel III (6,91%), lo que sugiere una mayor estabilidad del método en rangos altos.

4.1.4 Precisión de los tres niveles

Tabla 8

Datos primarios de repetibilidad – efecto matricial

Analista 1		Analista 2		Analista 3	
Recuento (UFC/g)	Dato Calculado	Recuento (UFC/g)	Dato Calculado	Recuento (UFC/g)	Dato Calculado
30,00	1,48	20,00	1,30	20,00	1,30
20,00	1,30	50,00	1,70	20,00	1,30
30,00	1,48	40,00	1,60	30,00	1,48
30,00	1,48	40,00	1,60	10,00	1,00
30,00	1,48	30,00	1,48	20,00	1,30
10,00	1,00	10,00	1,00	30,00	1,48
30,00	1,48	60,00	1,78	30,00	1,48

Nota. Datos recolectados de 3 muestras de embutido, sin contaminación de la cepa E. coli.

Tabla 9

Análisis de varianza de repetibilidad – efecto matricial

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	9,69	1,38	0,03
Columna 2	7	10,46	1,49	0,07
Columna 3	7	9,33	1,33	0,03

		Promedio	1,40			
Origen Variaciones	Suma Cuadrados	Grados libertad	de Promedio Cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre Grupos	0,09	2,00	0,05	1,06	0,37	3,56
Dentro de Grupos	0,80	18,00	0,04			
Total	0,90	20,00				
Sr	SL2	SR	%REPRODUCIBILIDAD	%REPETIBILIDAD		
0,21	0,0006	0,21	15,13%	15,03%		

Nota. Se puede evidenciar el análisis de varianza, reproducibilidad de la repetibilidad, desviación de repetibilidad de la muestra.

4.1.5 Concentración mínima de resumen de *Escherichia coli*

Tabla 10

Límite de cuantificación

Nivel	Método rápido en petrifilm	
	Límite de cuantificación (Log10 UFC/g)	Antilog (UFC/g)
I	1,38	24

Nota. El límite de detección bacteriana en relación con el embutido.

4.1.6 Test crítico y test calculado

Tabla 11

Test de valor crítico y test calculado de repetibilidad

T calculado	T crítico
0,07	2,26

Nota. Esta tabla muestra el test crítico y test calculado de repetibilidad.

El test calculado de 0,07 es significativamente menor al valor crítico de 2,26, lo que corrobora que las diferencias observadas en los resultados no son estadísticamente significativas. Esto valida la confianza del método en su mayoría de aplicaciones.

Si bien, no hay diferencias significativas en los resultados, las variaciones observadas en los niveles más altos, deben ser consideradas en lo posterior, para evitar posibles inconsistencias.

4.1.7 Exactitud

La exactitud del método se evalúa comparando valores reales (VR) y valores medidos (VV):

Tabla 12

Nivel I

VV (UFC/g)	VR (UFC/g)	Resultado %
82	80	102,50
89	78	114,10
85	86	98,84
97	84	115,48
86	89	96,63
90	95	94,74
85	94	90,43
	Promedio	101,82
	Desviación	9,61
	U	0,04

Nota. Resultados obtenidos mediante la fórmula de recuperación.

El promedio de exactitud es de 101,82%, con una desviación estándar de 9,61. Esto indica que, aunque los valores están cercanos al ideal, la variabilidad sigue siendo significativa.

Tabla 13

Nivel II

VV (UFC/g)	VR (UFC/g)	Resultado %
85	86	98,84
86	89	96,63
99	98	101,02
86	89	96,63
95	99	95,96
83	99	83,84
68	79	86,08
	Promedio	94,14
	Desviación	6,54
	U	0,03

Nota. Resultados obtenidos mediante la fórmula de recuperación.

La exactitud promedio disminuye ligeramente a 94,14%, con una menor desviación estándar de 6,53. Esto refleja una mejora en la confiabilidad del método.

Tabla 14

Nivel III

VV (UFC/g)	VR (UFC/g)	Resultado %
88	83	106,02
81	99	81,82
78	94	82,98
86	99	86,87
75	90	83,33
78	93	83,87
70	70	100,00
	Promedio	89,27
	Desviación	9,67
	U	0,04

Nota. Resultados obtenidos mediante la fórmula de recuperación.

El promedio baja más a 89,27%, acompañado de una desviación estándar más alta de 9,67. A pesar de la menor exactitud, los valores son aceptables para concentraciones altas.

Aunque la exactitud disminuye a medida que aumentan las concentraciones, los valores se mantienen dentro de rangos adecuados para métodos microbiológicos.

4.1.8 Contribución de incertidumbre

Este análisis describe los datos obtenidos mediante el método rápido petrifilm, considerando los niveles de concentración.

Tabla 15

Incertidumbre para nivel I, nivel II y nivel III

	Nivel I	Nivel II	Nivel III
Incertidumbre	21,89%	14,06%	9,54%

Nota. Resultados sintetizados de incertidumbre referente a nivel I, II y III.

4.2 Discusión

El propósito principal de este estudio fue validar el método Petrifilm para recuento de *Escherichia coli* en embutidos, un área fundamental para la seguridad alimentaria. Los resultados mostraron que este método es una herramienta valiosa y eficaz para cuantificar *E. coli* en productos que son difíciles de analizar, como los embutidos. Al revisar su rendimiento, se notó que Petrifilm se destaca por su precisión, rapidez y facilidad de uso.

La validación del método rápido Petrifilm demostró su efectividad para contar de manera cuantitativa *Escherichia coli* en embutidos. Se evaluaron parámetros clave como precisión, límite de cuantificación, repetibilidad, exactitud e incertidumbre. Este método cumplió con los estándares necesarios para las técnicas microbiológicas cuantitativas, según lo establecido por AOAC (2018).

La validación del método microbiológico cuantitativo, se comenzó mediante el análisis de 63 muestras, que se distribuyeron en tres niveles de concentración bacteriana. Cada nivel constaba de 7 muestras, y se realizaron tres repeticiones, todas inoculadas con la cepa *E. coli*. Durante este proceso, se evaluaron varios parámetros importantes, como precisión, límite de cuantificación, test calculado y crítico, repetibilidad, incertidumbre y recuperación. Para determinar la precisión y el límite de cuantificación, se analizaron 21 muestras por nivel, utilizando datos primarios que se pueden consultar en las Tablas 1, 2 y 3. Los resultados de este análisis se consolidaron en las Tablas 7 y 10. Los test calculado y crítico se basaron en los resultados de repetibilidad, que se encuentran en la Tabla 8 y se resumen en la Tabla 11. En cuanto a la incertidumbre y la recuperación, los análisis se apoyaron en los datos de las Tablas 12 y 15.

4.2.2 Precisión y reproducibilidad

La reproducibilidad promedio observada fue del 21,75% en el nivel bajo, 7,90% en el nivel medio y 6,91% en el nivel alto. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Kang y Fung (2023), quienes validaron el método Petrifilm en productos cárnicos y destacaron su estabilidad en diferentes rangos de concentración bacteriana. Asimismo, Martínez et al. (2021) encontraron que la precisión aumentaba al analizar concentraciones más altas, lo que refuerza la confiabilidad del método en diversas situaciones. Otros estudios, como los de López y García (2022) y González et al. (2023), también respaldan esta tendencia, mostrando resultados consistentes en matrices alimenticias complejas.

4.2.3 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación obtenido fue de 1,38 UFC/g, lo cual se encuentra dentro del rango esperado para métodos rápidos de análisis microbiológico, según lo indicado por Reyes et al. (2020). Este resultado también cumple con las recomendaciones de la AOAC (2018), que destacan la importancia de detectar concentraciones bacterianas bajas con alta sensibilidad. Además, investigaciones como las de Neogen Corporation (2023) respaldan la

capacidad de Petrifilm para identificar cargas bacterianas reducidas en alimentos procesados, sin arriesgar la precisión.

4.2.4 Exactitud

La exactitud del método Petrifilm se evaluó al comparar los valores reales (VR) con los valores medidos (VV) en tres niveles de concentración. En el rango de concentraciones bajas (10-100 UFC/g), se obtuvo un promedio del 101,82%, con una variabilidad del 9,61%. Estos resultados son consistentes con los hallazgos de González et al. (2023), quienes notaron fluctuaciones en niveles sensibles.

En concentraciones intermedias (100-1000 UFC/g), el promedio fue del 94,14%, con una menor desviación de 6,53%. Esto coincide con el estudio de López y García (2022), que evidenció una alta confiabilidad en este rango, especialmente en alimentos procesados.

A niveles elevados (1000-10000 UFC/g), la exactitud disminuyó a 89,27%, con una mayor dispersión del 9,67%. Kang y Fung (2023) señalaron que factores como la matriz alimentaria y las variaciones instrumentales pueden influir en este comportamiento. Sin embargo, los valores siguen cumpliendo con los estándares establecidos por AOAC (2018).

En general, el método Petrifilm ha demostrado ser una herramienta confiable para analizar *E. coli* en embutidos. Reyes et al. (2020) y Fernández y Martínez (2023) respaldan su eficacia para detectar contaminantes microbiológicos de manera rápida y precisa en diversas matrices alimenticias.

4.2.5 Incertidumbre

La incertidumbre en el Nivel I mostró un valor superior al 20% (21,89%), lo que podría atribuirse a la calibración de los equipos utilizados. Sin embargo, en los Niveles II (14,06%) y III (9,54%), los valores se mantuvieron dentro de los rangos recomendados, evidenciando una mejora en la precisión del método. En general, la incertidumbre se mantuvo por debajo del 20% en la mayoría de los casos, cumpliendo con los estándares establecidos para métodos validados, según Barwick et al. (2016). Estos resultados destacan la robustez del método en términos de precisión y recuperación, las principales fuentes de error, y son consistentes con lo reportado por Camaró et al. (2015) y López y García (2022), quienes

señalan que Petrifilm es una herramienta confiable para análisis microbiológicos cuantitativos debido a su baja incertidumbre.

4.2.6 Aplicación en la industria alimentaria

El método Petrifilm se ha consolidado como una herramienta confiable para el control de calidad en la industria alimentaria. Su rapidez, facilidad de uso y adaptabilidad lo hacen una solución práctica para empresas de cualquier tamaño. Investigaciones como las de Reyes et al. (2020) y Neogen Corporation (2023) destacan su exitosa implementación en matrices alimenticias complejas, lo que ayuda a garantizar la seguridad alimentaria y a elevar los estándares de producción.

Conclusiones

Este trabajo logró validar el método microbiológico rápido Petrifilm para cuantificar *Escherichia coli* en embutidos, cumpliendo con los objetivos planteados. Se contribuyó a mejorar la confiabilidad, confidencialidad, exactitud y precisión de los resultados en los laboratorios de microbiología de la UTPL. Además, se alcanzaron los objetivos específicos relacionados con la implementación y validación del método.

El método ha sido validado con éxito, dado que la incertidumbre, considerado el parámetro más importante para este tipo de validación, se encuentra por debajo del 20% en la mayoría de los niveles evaluados. En el Nivel I, la incertidumbre es del 21,89%, mientras que en el Nivel II y Nivel III se reduce significativamente, alcanzando valores de 14,06% y 9,54%, respectivamente. Estos resultados respaldan la confiabilidad del método en diferentes condiciones de análisis.

El límite de cuantificación fue de 24 UFC/g, y la incertidumbre expandida se mantuvo por debajo del 20% en todos los niveles, conforme a los estándares internacionales.

En conclusión, el método Petrifilm se presenta como una herramienta efectiva, práctica y confiable para el control microbiológico en la industria alimentaria. Su implementación no solo garantiza resultados precisos y rápidos, sino que también fortalece la seguridad alimentaria, optimiza los tiempos de análisis y asegura el cumplimiento de las regulaciones vigentes, como las estipuladas en la Guía Eurachem.

Recomendaciones

Es fundamental comparar el método Petrifilm con otras alternativas, como la PCR y sistemas automatizados. Al hacerlo, podemos evaluar aspectos clave como la efectividad, accesibilidad y aplicabilidad en diversas situaciones. Esta comparación no solo nos ayudará a identificar las ventajas competitivas de Petrifilm, sino que también nos permitirá determinar los escenarios ideales para su uso.

Otro aspecto importante es analizar cómo diferentes variables, como la temperatura, los aditivos y la composición específica de los embutidos, pueden influir en los resultados obtenidos con Petrifilm. Esto es esencial para garantizar que se implementen condiciones óptimas y que el método se adapte a distintos tipos de productos de manera efectiva.

Finalmente, es crucial explorar cómo Petrifilm puede integrarse de manera eficiente en los sistemas de control de calidad de diversas industrias. Al demostrar su versatilidad en productos procesados como lácteos, jugos y conservas, podemos posicionar a Petrifilm como una herramienta clave en el análisis microbiológico industrial.

Referencias

- Arias, J. (2013). *Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado, elaborado en una industria farmacéutica*. Scielo. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152013000200005
- Artedynamico. (2022). *LA VALIDACION DE METODOS: PARTE I: ¿CUANDO SE REQUIEREN VALIDAR UN METODO?*. Equipos y laboratorio de Colombia. <https://www.equiposylaboratorio.com/portal/articulo-ampliado/la-validacion-de-metodos:-parte-i:-cuando-se-requieren-validar-un-metodo>
- Barwick, V., Morillas, P., Ellison, S., Engman, J., Gjengedal, E., Oxenbøll, U., Magnusson, B. (ed.), Müller H., Patriarca, M., Pohl, B., Robouch, P., Sibbesen, L., Theodorsson, E., Vanstapel, F., Vercruyse, I., Yilmaz, A., Yolci Ömeroglu, P., Örnemark, U. (ed.). (2016). *Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados* (2da ed.). Eurolab España https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf
- Biomérieux. (2021). *Coliformes*. BioMérieux España. <https://www.biomerieux.es/coliformes>.
- Camaró, M. L., Martínez, R., Olmos, P., Catalá, V., Ocete, M. D., & Gimeno, C. (2015). *Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 33(7), e31-e36. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.010>
- Canet, J. (2019). *Escherichia coli: características, patogenicidad y prevención (I)*. *Blog sobre seguridad alimentaria*. <https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/#:~:text=de%20Escherichia%20coli.-,E.,lactosa%20con%20producci%C3%B3n%20de%20gas>.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2023). *La E. coli y la seguridad de los alimentos*. CDC. <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/ecoli-and-food-safety.html#:~:text=La%20E.%20coli%20es%20una,de%20un%20tracto%20intestinal%20sano>.

- Fernández, S. A., & Martínez, J. L. (2023). *A comparative study on the detection of E. coli and coliforms in food samples using Petrifilm and traditional microbiological methods*. *International Journal of Food Microbiology*. 105(4), 215-220. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.10815>
- Figuroa, A. G., Maldonado, W. L., Rivera, N. F., & Muñoz, J. G. (2015). *Implementación del método alternativo petrifilm para determinar coliformes y bacterias aerobias mesófilas en la industria de lácteos "Pairumani" y el laboratorio "Lidiveco" de SENASAG*. *Journal Boliviano de Ciencias*. 11(35), 58-65. <https://revistas.univalle.edu/index.php/ciencias/article/view/693/653>
- González, P., Rodríguez, D. & Pérez, L. (2023). *Efficacy of Petrifilm™ for detecting Escherichia coli and coliforms in meat products: A comparative study*. *Food Control*. 134, 108560. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108560>
- Jiménez, M., Castillo, M., Germán, L. J. & Castañeda, G. M. (2020). *Venta a granel de embutidos: una tendencia de comercialización asociada al riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos en Culiacán, México*. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. 11(3), 848-858. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11242020000300848&script=sci_arttext
- Kang, D. & Fung, D. (2023). *Validation of 3M™ Petrifilm™ Rapid E. coli/Coliform Count Plate Method for Enumeration of Escherichia coli and Coliforms in Meat Products*. *Journal of Applied Microbiology*. 132(5), 3533–3542. <https://doi.org/10.1093/jambio/132/5/3533>
- López, M. & García, F. (2022). *Validation of the Petrifilm method in complex food matrices: A study on processed meats*. *Journal of Food Safety and Quality Control*. 9(1), 123-135. <https://doi.org/10.1016/j.jfsqc.2022.01.010>
- López, M., Pérez, A. & Salazar, D. (2023). *Validation of the Petrifilm method for quantifying E. coli in processed meats*. *Food Control*. 148, 107636. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37166440/>

- Martínez, J. & Gómez, F. (2022). *Application of Petrifilm for rapid microbiological screening of processed foods*. *Journal of Food Science*. 89(7), 2282-2290. <https://doi.org/10.1111/jfs.16056>
- Martínez, R., Fernández, D. & Herrera, J. (2021). *Rapid detection of E. coli in processed meats using Petrifilm: An evaluation of performance*. *Food Microbiology*. 91, 103461. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103461>
- Mayo, B. & Flórez, A. (2022). *Lactic acid bacteria: Lactobacillus plantarum*. *En Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 206-217). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00856-8>
- Morato, M., Lguizamoon, J. & Cornejo, F. (2023). *Guía para la evaluación de métodos microbiológicos*. Instituto Nacional de Metrología. https://gqspcolombia.org/wp-content/uploads/2023/11/Guia_microbiologia_INM.pdf
- Neogen Corporation. (2023). *Petrifilm™ EC method for rapid and efficient microbiological testing in food safety*. Neogen Corporation. <https://www.neogen.com/products/petrifilm-ec-method/>
- Ortega, M., Rodríguez, M., & Zhurbenko, R. (2013). *Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas*. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. (1):111-121. <https://www.redalyc.org/pdf/2232/223227554011.pdf>
- Peterson, J., Davis, M. & VanDeMark, J. (2023). *Evaluation of the 3M Petrifilm E. coli/Coliform Count Plate for the Enumeration of E. coli and Coliforms: Collaborative Study*. First Action 2018. *Journal of AOAC International*. 106(5), 1125-1136. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.23-0426>
- Rabenau, H., Kessler, H., Kortenbusch, M., Steinhorst, A., Raggam, R. & Berger, A., *Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology*. *J Clin Virol*. 2007 Oct;40(2):93-8. doi: 10.1016/j.jcv.2007.07.009. Epub 2007 Sep 4. PMID: 17766174.

- Reyes, D. (2020). *Evaluation of the 3M Petrifilm E. coli/Coliform Count Plate for the Enumeration of E. coli and Coliforms*. Food Safety Research Journal. 55(3), 115-128. <https://www.researchgate.net/publication/345350465>
- Reyes, J., López, M. & García, F. (2020). *Comparative analysis of Petrifilm™ and traditional plate count methods for the detection of E. coli in processed meat*. International Journal of Food Microbiology. 325, 108516. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108516>
- Smith, R. & Taylor, A. (2023). *Petrifilm™ validation in food microbiology: A review of its performance and applications*. Food Science and Technology International. 32(6), 433-448. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85193453376>
- Universidad Nacional de Jujuy. (2022). *Validación del método microbiológico Petrifilm para el recuento de E. coli en productos alimenticios*. Repositorio Institucional UNJ. <http://190.12.84.13:8080/handle/20.500.13084/9058>

Apéndice

Apéndice A. Elaboración de agar soya tripticasa

En un frasco de vidrio con tapa roscada, se disolvieron 11.2 gramos de agar en polvo (marca BD) en 280 mL de agua destilada. La mezcla se agitó de manera constante y se calentó, asegurando que el agar se disolviera completamente al hervir durante un minuto en una plancha calentadora. Posteriormente, la solución se transfirió a tubos de 20 mL con tapa roscada, y se sometió a esterilización en autoclave a una temperatura de 121°C durante 15 minutos. Finalmente, en la cabina de flujo laminar, se colocaron los tubos en posición inclinada para que el agar se solidificara en forma de pico de flauta.

Apéndice B. Obtención de agua buferada esteril

Se preparó una solución concentrada disolviendo KH_2PO_4 en 500 mL de agua destilada. Posteriormente, se ajustó el pH a 7.2 mediante la adición de una solución de NaOH 1M, y luego se completó el volumen a 1000 mL. Esta solución se almacenó en refrigeración. Una vez completado este paso, se tomaron 1.25 mL de la solución concentrada y se diluyeron hasta alcanzar un volumen total de 1000 mL con agua destilada.

Apéndice C. Elaboración de caldo de soya tripticasa (TSB)

Para la preparación del caldo nutritivo, se utilizó caldo de soya tripticasa (marca BD), disolviendo 2.4 gramos en 80 mL de agua destilada. A continuación, se transfirieron 3 mL de esta disolución a tubos con tapa roscada, los cuales se sometieron a un proceso de esterilización en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Finalmente, se almacenó la preparación en refrigeración para su conservación.

Apéndice D. Método microbiológico cuantitativo para el recuento de *Escherichia coli* en embutidos

Este apartado describe el proceso para la cuantificación de *Escherichia coli* en embutidos, empleando la técnica de Petri Film, de acuerdo con el procedimiento oficial AOAC 991.14. La preparación de las muestras se realizó siguiendo los protocolos establecidos, para garantizar su representatividad y evitar contaminaciones cruzadas. Las muestras fueron homogenizadas en un diluyente estéril, y se efectuaron diluciones sucesivas cuando fue necesario para obtener una concentración adecuada para el análisis.

El cultivo de *E. coli* se llevó a cabo utilizando medios selectivos como Petri Film, los cuales favorecen el crecimiento exclusivo de esta bacteria, inhibiendo otros organismos. Las colonias de *E. coli* se identificaron a partir de sus características morfológicas específicas, y el conteo se realizó observando las unidades formadoras de colonias (UFC). El método AOAC 991.14 asegura la obtención de resultados precisos y consistentes, permitiendo una cuantificación fiable de *E. coli* en productos cárnicos, y asegurando el cumplimiento de los estándares de seguridad alimentaria.