



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La universidad católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

INGENIERO EN ALIMENTOS

Validación de métodos microbiológicos: *E.coli* y Enterobacterias
en alimentos.

TRABAJO DE TITULACIÓN

Autor: Cajilima Sánchez, Joffre Paúl.

Directora: Hualpa Salinas, Diana Inés.

Loja – Ecuador
2021



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>

2021

Aprobación del director del trabajo de titulación.

Loja, 12 de marzo del 2021

Magister

Jorge Felipe Reyes Bueno

Coordinador de la carrera de Ingeniería en alimentos

Ciudad.-

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Validación de métodos microbiológicos: *e.coli* y enterobacterias en alimentos; realizado por Cajilima Sánchez Joffre Paúl ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo. Así mismo, doy fe que dicho Trabajo de Titulación ha sido revisado por la herramienta antiplagio institucional.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente:

Firma:.....

Diana Inés Hualpa Salinas

CI: 1102806062

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Joffre Paul Cajilima Sánchez, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

- Ser autor del Trabajo de Titulación denominado: Validación de métodos microbiológicos: *E.coli* y *Enterobacterias* en alimentos, de la Titulación de Ingeniero en Alimentos específicamente de los contenidos comprendidos en: Capítulo 1. Marco teórico. Capítulo 2. Objetivos. Capítulo 3. Metodología. Capítulo 4. Resultados y discusión. Conclusiones y Recomendaciones; siendo la Mgtr. Diana Inés Hualpa Salinas, directora del presente trabajo; y, en tal virtud, 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. Además, ratifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.
- Que mi 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".
- Autorizo a la Universidad Técnica Particular de Loja para que pueda hacer uso de mi obra con fines netamente académicos, ya sea de forma impresa, digital y/o electrónica o por cualquier medio conocido o por conocerse, sirviendo el presente instrumento como la fe de mi completo consentimiento; y, para que sea ingresada 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.

Firma:

Autor: Joffre Paúl Cajilima Sánchez.

CI: 1751733377

Dedicatoria

Principalmente dedico este proyecto a mis padres porque supieron apoyarme y brindarme su amor y comprensión; por motivarme a seguir adelante con mis sueños y proyectos; y por ayudarme con todo lo que estuvo a su alcance durante el transcurso de mi carrera, concluyéndola con éxito.

Se lo dedico a Dios, por permitirme salir adelante cada día en este período universitario, ya que, gracias a él estoy culminando esta etapa de mi vida.

También se lo dedico a mi segunda familia Puchaicela Salinas quienes compartieron su tiempo y conocimiento ayudándome día a día.

Finalmente, se lo dedico a mi abuelita María Sánchez, que, estuvo a mi lado desde pequeño llenándome de amor.

Joffre Paúl Cajilima Sánchez.

Agradecimiento

Principalmente agradezco a mis padres, por ser mi ejemplo a seguir, por estar en cada momento que los necesitaba y por brindarme su amor incondicional día a día. Sin sus palabras de apoyo, nunca hubiera seguido adelante.

Agradezco a Dios por brindarme sabiduría, y por ser la luz que guía mi camino por el sendero correcto y por no permitir que me rinda nunca.

También agradezco a mis amigos y pareja, que son personas muy especiales para mí, y que estuvieron apoyándome desde un principio para vivir mis sueños y que se hagan realidad.

Así también agradezco a mi director de tesis, Mgtr. Diana Hualpa por brindarme su tiempo y dedicación, e impartirme sus conocimientos durante mi proceso de tesis.

Joffre Paúl Cajilima Sánchez.

Índice de Contenido

Aprobación de la director del trabajo de titulación.	II
Declaración de autoría y cesión de derechos	III
Dedicatoria	V
Agradecimiento	VI
Índice de Contenido	VII
Índice de figuras	XI
Índice de tablas	XII
Índice de gráficos	XIV
Abreviaturas	XV
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo uno	5
(Marco teórico)	5
1. Validación de métodos microbiológicos.	5
1.1 Método Normalizado	5
1.2 Método modificado.	6
1.3 Método alternativo.	7
1.4 Método interno.	7
1.5 Parámetros de validación.	8

1.5.1 Linealidad	8
1.5.2 Precisión	8
1.5.3 Repetibilidad	9
1.5.4 Reproducibilidad	9
1.5.5 Robustez	9
1.5.6 Límite de detección	9
1.5.7 Límite de cuantificación	10
1.6 Validación de método normalizado	10
1.6.1 Recuento de <i>E. coli</i>, método oficial AOAC 991.14	10
1.6.2 Recuento de Enterobacterias, método oficial AOAC 2003.01	10
1.7 Acreditación de laboratorio de microbiología	11
1.8 Plan de validación	11
1.8.1 Cepas de referencia	11
1.9 Enfermedades de transmisión alimentaria (ETA)	12
1.9.1 Vías de Transmisión	13
1.9.2 Clasificación	13
1.9.3 Prevención	13
1.10 Calidad microbiológica del queso	14
Capítulo dos	15
(Objetivos)	15
2.1 General	15

2.2 Específicos	15
Capítulo tres	16
(Materiales y métodos)	16
3.1 Recolección y preparación de las muestras.	16
3.2 Procedimiento para preparar muestra de referencia.....	16
3.3 Procedimiento para crioconservación de cepas.	17
3.4 Metodología.....	18
3.5 Recuento de <i>Escherichia coli</i>	18
3.6 Recuento de Enterobacterias.....	20
3.7 Procedimiento de recuperación.....	22
3.8 Cálculos para parámetros de validación.....	23
Capítulo cuatro.....	25
(Resultados y discusiones).....	25
4.1 Resultados experimentales.....	25
4.2 Linealidad (Proporcionalidad).....	27
4.3 Validación del rango de trabajo.	29
4.4 Limite de detección y límite de cuantificación.....	30
4.5 Exactitud del método por cada nivel y una gráfica.	32
4.6 Precisión del método.....	41
4.6.1 Precisión control.....	41
4.6.2 Datos y resultados de la Repetibilidad del método.	43

4.6.3 Reproducibilidad del método	44
4.7 Incertidumbre del método	45
Conclusiones	50
Recomendaciones	51
Referencias	52
Apéndices	55
Apéndice A. Preparación de reactivos	55
Apéndice B. Incertidumbre	56
Apéndice C. Fórmulas para determinar el límite de detección y límite de cuantificación . 58	
Apéndice D. tabla estadística de la distribución T de student	59

Índice de figuras

Figura 1 , Preparación de muestra de queso.....	16
Figura 2 , Siembra de cepa <i>Escherichia coli</i>	17
Figura 3 , Crioconservación de cepas.	18
Figura 4 , Preparación de material.	19
Figura 5 , Siembra de <i>Escherichia coli</i>	20
Figura 6 , Siembra de Enterobacterias.	21
Figura 7 , Recuperación de <i>E.coli</i>	22
Figura 8 , Recuperación de Enterobacterias	22

Índice de tablas

Tabla 1, <i>Datos experimentales de tres niveles de E.coli.</i>	25
Tabla 2, <i>Datos experimentales de tres niveles de Enterobacterias.</i>	26
Tabla 3, <i>Linealidad de los tres niveles en E.coli.</i>	27
Tabla 4, <i>Linealidad de los tres niveles en Enterobacterias.</i>	28
Tabla 5, <i>Rango de trabajo de los tres niveles de E.coli.</i>	29
Tabla 6, <i>Rango de trabajo de los tres niveles de Enterobacterias.</i>	29
Tabla 7, <i>Límite de detección y cuantificación de Escherichia coli.</i>	30
Tabla 8, <i>Límite de detección y cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) en E.coli.</i>	30
Tabla 9, <i>Límite de detección y cuantificación de Enterobacterias.</i>	31
Tabla 10, <i>Límite de detección y cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) en Enterobacterias.</i>	31
Tabla 11, <i>Carta de control para los tres niveles en E.coli.</i>	32
Tabla 12, <i>Porcentajes de recuperación del primer nivel en E.coli.</i>	32
Tabla 13, <i>Exactitud en E.coli primer nivel</i>	32
Tabla 14, <i>Porcentajes de recuperación del segundo nivel en E.coli.</i>	33
Tabla 15, <i>Exactitud en E.coli segundo nivel.</i>	34
Tabla 16, <i>Porcentajes de recuperación del tercer nivel en E.coli.</i>	35
Tabla 17, <i>Exactitud en E.coli tercer nivel</i>	35

Tabla 18, Carta de control para los diferentes niveles en Enterobacterias	36
Tabla 19, Porcentajes de recuperación del primer nivel de Enterobacterias	36
Tabla 20, Exactitud de Enterobacterias primer nivel	37
Tabla 21, Porcentajes de recuperación del segundo nivel de Enterobacterias	38
Tabla 22, Datos para determinar la exactitud del segundo nivel en Enterobacterias	38
Tabla 23, Porcentajes de recuperación del tercer nivel Enterobacterias	39
Tabla 24, Datos para determinar la exactitud del tercer nivel en Enterobacterias	40
Tabla 25, Precisión y control en Escherichia coli	41
Tabla 26, Sumatoria de los valores logarítmicos de precisión en E.coli	41
Tabla 27, Precisión y control en Enterobacterias	42
Tabla 28, Sumatoria de los valores logarítmicos de precisión en Enterobacterias	42
Tabla 29, Repetibilidad en los tres niveles de E.coli	43
Tabla 30, Repetibilidad en los tres niveles de Enterobacterias	43
Tabla 31, Reproducibilidad en E.coli	44
Tabla 32, Reproducibilidad en Enterobacterias	44
Tabla 33, Incertidumbre en los tres niveles de Escherichia coli	45
Tabla 34, Incertidumbre de los tres niveles de Enterobacterias	46

Índice de gráficos

Grafico 1 , Análisis de la linealidad de <i>Escherichia coli</i> , entre el valor objetivo y el resultado experimental.	27
Grafico 2 , Análisis de la linealidad de Enterobacterias, entre el valor objetivo y el resultado experimental.	28
Grafico 3 , Exactitud del primer nivel en <i>E.coli</i>	33
Grafico 4 , Exactitud del segundo nivel <i>E.coli</i>	34
Grafico 5 , Exactitud del tercer nivel <i>E.coli</i>	36
Grafico 6 , Exactitud del primer nivel Enterobacterias.	37
Grafico 7 , Exactitud del segundo nivel Enterobacterias.....	39
Grafico 8 , Exactitud del tercer nivel Enterobacterias.	40

Abreviaturas

AOAC	Association of official analytical chemists (Asociación de químicos analíticos oficiales)
ETA	Enfermedades de transmisión alimentaria
OMS	Organización mundial de la salud
OPS	Organización panamericana de la salud
FAO	Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura
SAE	Servicio de acreditación ecuatoriano
OAA	Organismo argentino de acreditación
PAE	Programa de alimentación escolar
ANMAT	Administración nacional de medicamentos, alimentos y tecnología medica
ISO	International Organization for Standardization (Organización Internacional de Normalización)
UFC	Unidades formadoras de colonias

Resumen

La validación de métodos microbiológicos normalizados contribuye a la confiabilidad, confidencialidad, exactitud y precisión de resultados en cuanto a pruebas microbiológicas en alimentos. El objetivo de este estudio fue establecer el protocolo de validación para recuento de *Escherichia coli* y Enterobacterias en queso. La validación se realizó mediante un método normalizado oficial de la Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), se trabajó con una cepa de *E. coli* certificada de la American Type Culture Collection (ATCC), se evaluó y validó el comportamiento de los microorganismos *Escherichia coli* y Enterobacterias en tres concentraciones alta, media, baja, los datos fueron obtenidos en UFC/g y posteriormente transformados a Log_{10} UFC/g. Se analizó los parámetros de precisión, exactitud, linealidad, límite de detección y cuantificación, además se calculó la incertidumbre de cada método. De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que los métodos microbiológicos para recuento de *E.coli* y Enterobacterias en queso son válidos y aptos para la aplicación propuesta.

Palabras clave: validación de métodos, *Escherichia coli*, *Enterobacterias*.

Abstract

Validation of standardized microbiological methods contributes to the reliability, confidentiality, accuracy and precision of results for microbiological tests on food. The objective of this study was to establish the validation protocol for the count of *Escherichia coli* and Enterobacteriaceae in cheese. Validation was carried out using an official standardized method of the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), working with a strain of *E. coli* certified by the American Type Culture Collection (ATCC), the behavior of *Escherichia* microorganisms was evaluated and validated *coli* and Enterobacteriaceae in three concentrations: high, medium, low, the data were obtained in CFU / g and later transformed to Log₁₀ CFU / g. The parameters of precision, accuracy, linearity, detection limit and quantification were analyzed, in addition the uncertainty of each method was calculated. According to the results obtained, it is concluded that the microbiological methods for counting *E.coli* and Enterobacteria in cheese are valid and suitable for the proposed application.

Keywords: Validation, *Escherichia coli*, Enterobacteria.

Introducción

Los protocolos de validación son aplicados como marco referencial, tanto para requisitos de gestión como para aspectos técnicos para laboratorios de ensayo y calibración con la finalidad de certificar que los resultados obtenidos sean exactos, estableciendo un control de variables para asegurar la trazabilidad y exactitud de los resultados; además nos permite actualizar ciertos aspectos de técnicas, usar nuevos equipos, nuevos medios, sobre todo minimizar costos y tiempo (Cercenado & Cantón, 2014). La importancia de validar métodos microbiológicos en alimentos radica en que las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) son una causa importante de morbilidad y mortalidad, provocando un impacto desfavorable para el sector de la salud (Urzúa, 2016).

La finalidad de este proyecto es aportar a la industria alimentaria métodos válidos y confiables para recuento de unidades formadoras de colonias UFC/g de alimento en lo que respecta a las bacterias *Escherichia coli* y Enterobacterias, ya que estas bacterias son indicadores de higiene y pueden perjudicar la salud del consumidor, siendo un problema para las empresas debido a que no están cumpliendo con los parámetros establecidos dentro de la norma técnica ecuatoriana.

En el primer capítulo del presente trabajo, se abarcan temas sobre los diferentes tipos de métodos de recuento, los parámetros y plan de validación, los microorganismos de estudio, se realiza una revisión de las principales enfermedades de transmisión alimentaria y la calidad microbiológica del queso; en el segundo capítulo se detallan los objetivos a cumplir; el tercer capítulo abarca lo referente a materiales y métodos donde se describe el proceso de preparación de medios de cultivo, manejo de cepas de referencia y siembra de cepas, junto con la metodología que se empleó para realizar los análisis y técnicas de recuento; en el cuarto capítulo se presentan las tablas de resultados de la parte experimental cuyos datos fueron recolectados

en una hoja electrónica de MS Excel®, utilizando las herramientas de análisis se obtuvieron los diferentes criterios para el plan de validación.

Para la ejecución de este proyecto se realizó los ensayos en donde se inoculó cepas de *E. coli* y Enterobacterias a diferentes concentraciones para determinar el comportamiento y porcentajes de concentración de contaminación en muestras de queso. Posteriormente se realizó las pruebas microbiológicas según la metodología normalizada de Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) y se obtuvieron los datos experimentales en UFC/g, estos siguen una distribución asimétrica por lo que fue necesario realizar una normalización previa a fin de realizar el análisis estadístico pertinente, para ello se transforman los datos de UFC/g a logaritmo de base 10 (\log_{10} UFC/g), para proceder al proceso de validación de los métodos.

Capítulo uno

(Marco teórico)

1. Validación de métodos microbiológicos.

La validación de métodos es un proceso mediante el cual un laboratorio confirma mediante un examen, y proporciona evidencia objetiva de que los requisitos particulares para fines específicos se cumplen. Sirve para demostrar que el método puede detectar e identificar un analito o analitos (FDA, 2019):

- Se realiza en una o varias matrices
- Con una sensibilidad demostrada, especificidad, veracidad, reproducibilidad, robustez y precisión para garantizar que los resultados sean significativos y apropiados para la toma de decisiones.
- Fiable para su propósito previsto. Las categorías incluyen, pero no pueden estar limitado a operaciones de emergencia o contingencia; cribado rápido, pruebas de alto rendimiento y análisis confirmatorios.

Después de que el desarrollador del método haya realizado experimentos para determinar o verificar un número de características de rendimiento específicas que sirven para definir o cuantificar el rendimiento del método.

1.1 Método Normalizado

El laboratorio aplica el método exactamente como esta descrito en la norma; se debe confirmar que el laboratorio está en condiciones óptimas para comprometerse llevarlo a cabo de forma correctamente previo a su uso en ensayos, mediante la comprobación del cumplimiento de los parámetros estadísticos que figuren dentro del método normalizado. (OAA, 2013). Los parámetros que determina son:

Ensayos cualitativos:

- Límite de detección.
- Verificación de la sensibilidad y la especificidad.

Ensayos cuantitativos:

- Linealidad
- Rango de trabajo
- Límite de detección y cuantificación
- Exactitud
- Precisión control
- Repetibilidad
- Reproducibilidad
- Incertidumbre

1.2 Método modificado.

El laboratorio realiza modificaciones al método de ensayo normalizado que pueden tener una repercusión sobre la calidad de los resultados. En el caso de los métodos microbiológicos se consideran modificaciones relevantes (OAA, 2013):

- Incluir en el alcance del método otra matriz que la especifica en el método normalizado.
- La utilización de medios de cultivos diferentes a los descritos en el método de referencia.
- Cambios en las condiciones de incubación (tiempo-temperatura).
- El uso de equipos críticos con distinta tolerancia a la especificada en el método normalizado.
- Utilización de un rango de recuento diferente al especificado.
- Utilización de una porción de ensayo o suspensión diferente.

1.3 Método alternativo.

El laboratorio utiliza métodos alternativos o también conocidos como métodos rápidos de confirmación, en estos casos se debe disponer de los datos de validación y el laboratorio debe realizar una verificación de su aplicabilidad, siguiendo los lineamientos establecidos en los métodos normalizados. Los datos de validación pueden obtenerse de ensayos colaborativos o de datos provistos por el fabricante y sometidos a la evaluación de una tercera parte (por ejemplo, la AOAC). Cuando no se disponga de los datos de validación o estos no sean plenamente aplicables el laboratorio tiene que realizar la validación antes de usar el método, siguiendo los lineamientos establecidos en la norma ISO 16140 (OAA, 2013).

1.4 Método interno.

En el caso de estos métodos la validación es mucho más exigente y deben ser adecuados y totalmente validados antes de su uso, ya que, al no disponerse de información previa sobre el desempeño del método, se deberían evaluar según características todos los parámetros de desempeño posibles, para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación. El diseño experimental y el análisis de los resultados tienen que ser estadísticamente válidos (OAA, 2013).

Los parámetros a validar son:

Ensayos cualitativos:

- Límite de detección
- Sensibilidad
- Especificidad
- Inclusividad / Exclusividad
- Robustez

Ensayos cuantitativos:

- Recuento de microorganismos totales.
 - Precisión (Repetibilidad + Precisión inmediata)
 - Límite de cuantificación
 - Rango validado
 - Incertidumbre de medición
 - Robustez
 - Recuento de microorganismo en medio selectivo/diferencial (además de los especificados en):
 - Sensibilidad
 - Especificidad
 - Inclusividad / Exclusividad

1.5 Parámetros de validación.

1.5.1 Linealidad.

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad que existe entre la concentración del analítico y su respuesta; además se determina el rango lineal, es decir el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima del analito para cual el método ha sido probado (META, 2015)

1.5.2 Precisión.

Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento analítico repetidas veces bajo condiciones establecidas. La precisión depende solo de la

distribución de errores aleatorios y se expresa como coeficiente de variación (Cercenado & Cantón, 2014).

1.5.3 Repetibilidad.

Es la precisión en las condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, el mismo operador, utilizando el mismo equipo de medida y durante un corto intervalo de tiempo. En el caso de que las condiciones establecidas cambien y la diferencia entre los resultados de ensayo pueda esperarse dentro de una determinada probabilidad, se la conoce como reproductibilidad (Cercenado & Cantón, 2014).

1.5.4 Reproductibilidad.

Es la precisión en las condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, sobre el mismo mesurando, pero con diferentes operadores, equipos de medida, en diferentes días, entre otros (Cercenado & Cantón, 2014).

1.5.5 Robustez.

Los métodos están sometidos a distintas interferencias químicas y físicas que contribuyen a la incertidumbre del análisis. La robustez es la insensibilidad de un método frente a pequeños cambios en el procedimiento (META, 2015).

1.5.6 Límite de detección.

Es la menor magnitud que puede analizarse de un analito con un nivel aceptable de exactitud y precisión. En los cultivos microbiológicos es el número mínimo de microorganismos que pueden ser detectados en una cantidad de muestra con una probabilidad dada, pero en cantidades que no pueden ser claramente cuantificadas. El límite de detección se calcula con el promedio de los recuentos obtenidos del medio de referencia del método a validar (Cercenado & Cantón, 2014).

1.5.7 Límite de cuantificación.

Es la concentración mínima de un analito que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión; se aplica a métodos cuantitativos (Cercenado & Cantón, 2014).

1.6 Validación de método normalizado.

1.6.1 Recuento de *E. coli*, método oficial AOAC 991.14

La siembra y recuento de *E.coli* y *Coliformes* se realiza en la misma placa debido a la adicción de 5-bromo 4-cloro 3- Indol- B-D-glucoronido que sirve como indicador. Cada placa petrifilm contiene nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias. La mayoría de las *E. coli* cerca del 97% produce beta-glucuronidasa, la que a su vez produce una precipitación azul que se relaciona con la colonia; las *Coliformes* aparecen como colonias rojas que tienen una o más burbujas de gas, la película superior del film atrapa el gas producido por *E. coli* y *Coliformes* fermentadores de lactosa logrando una mejor identificación (AOAC, 1994).

1.6.2 Recuento de *Enterobacterias*, método oficial AOAC 2003.01

La siembra y recuento de *Enterobacterias* se realizar en placas petrifilm de medio seco, con nutrientes de glucosa biliar rojo violeta, pH indicador, gel soluble en agua fría y tetrazolio como tinte indicador. La película superior atrapa el gas producido por algunas bacterias que aparecen como colonias rojas rodeadas por una zona amarilla. Las bacterias productoras de gas o ácido son consideradas presuntamente *Enterobacterias* y presentan las siguientes características: colonias rojas asociadas a burbujas de gas y sin zonas ácidas, colonias rojas con zonas ácidas y sin burbujas de gas, colonias que producen tanto zona ácida como burbujas de gas. Las colonias rojas sin halo ni burbujas de gas no se deben contar, tampoco las colonias que

han crecido sobre la barrera de espuma, ya que la selectividad del medio en esta zona es reducida (AOAC, 2003).

1.7 Acreditación de laboratorio de microbiología.

El Servicio de Acreditación Ecuatoriano SAE es el organismo público que se encarga de la acreditación de los organismos de la evaluación de la conformidad. Es una entidad adscrita del Ministerio de Industrias y Productividad, que tienen como misión y visión (SAE, 2007):

- Acreditar la competencia técnica de los organismos que operan en materia de evaluación de la conformidad.
- Ser un organismo de acreditación reconocido a nivel regional como referente de la acreditación de la evaluación de la conformidad, que genere confianza en las autoridades locales, mercados nacionales e internacionales y la sociedad en general, facilitando el comercio mediante los acuerdos de aceptación global de los resultados de la evaluación de la conformidad.

Para que un laboratorio este correctamente acreditado, debe basarse en la normativa internacional ISO/IEC 17015 que proporciona los requisitos necesarios que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración, facilitando la armonización de criterios de calidad; detallando los puntos a demostrar para un sistema de calidad, técnicas competentes y capaces de generar resultados técnicamente válidos (ISO/IEC17025, Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración, 2005).

1.8 Plan de validación.

1.8.1 Cepas de referencia.

Las cepas de referencia son cultivos conservados y distribuidos por colecciones de cultivos autorizados, se encuentran definidos como mínimo a nivel de género y especie.

La cepa que se utilizó para realizar la validación de los métodos microbiológicos de *Escherichia Coli* y Enterobacterias, fue adquirida en el laboratorio de “Microbiologics” numero de referencia: ATCC^R 11775TM*. Se utilizan para demostrar la trazabilidad, es un material de referencia certificado biológico.

Escherichia coli: son bacilos gramnegativos, no esporulados y miden de 1.0 a 1.0 micrómetros. Los gérmenes móviles de esta familia poseen flagelos peritricos, representan el 1% de la población bacteria intestinal, algunas bacterias suelen denominarse Coliformes debido a que poseen la misma forma de *Escherichia coli* y son habitantes normales del tubo digestivo (Urzúa, 2016).

Enterobacterias: la familia de las *Enterobacterias (Enterobacteriaceae)* incluye múltiples géneros y especies de bacilos gramnegativos, algunos de los cuales son patógenos para el ser humano; tienen una amplia distribución en el agua, el suelo, las plantas y la flora intestinal de muchos animales y del hombre. Algunas especies *Shigella spp*, *Salmonella*, *Yersinia pestis* se han adaptado al ser humano y se consideran patógenos primarios, mientras que otras como *Escherichia coli*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp*, entre otras forman parte del microbiota normal, pero pueden comportarse como patógenos oportunistas afectando la salud del huésped (Fariñas & Luis, 2014)

1.9 Enfermedades de transmisión alimentaria (ETA).

Las enfermedades de transmisión alimentarias (ETA) comprenden varias dolencias y constituyen un problema de salud a nivel mundial, convirtiéndose en una importante causa de morbilidad y mortalidad impidiendo el desarrollo socioeconómico de los países. Se estima que 1 de cada 10 personas sufre de ETA, provocando la pérdida de 33 millones de vidas saludables, generando alrededor de 420.000 muertes al año de las cuales 1/3 son niños menores de 5 años;

la mitad de esas enfermedades son provocadas por 31 agentes etiológicos, de los cuales los principales son: *Norovirus*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* y *Salmonella* (OMS, 2015).

1.9.1 Vías de Transmisión.

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) son transferidas al ser humano por la ingesta de alimentos contaminados. Los contaminantes pueden ser químicos (compuestos inorgánicos tóxicos, antimicrobianos, promotores del crecimiento, aditivos tóxicos, lubricantes y tintas, toxinas naturales, desinfectantes, metales y pesticidas); físicos (fragmentos de vidrio, madera, u otros que puedan ocasionar daño al consumidor) y biológicos (bacterias, parásitos, e incluso abióticos como virus y priones), más del 50 % de ETA tienen una etiología viral (Rodríguez Torrens, Sedres Cabrera, Bertot Valdés, Martínez Saéz, & Guevara Viera, 2015).

1.9.2 Clasificación.

- Intoxicación alimentaria: intoxicación causada por alimentos, se produce por la ingestión de toxinas o venenos que se encuentran presentes en el alimento ingerido, y que han sido producidas por hongos o bacterias, aunque éstos ya no se hallen en el alimento (ANMAT, 2015).
- Infección alimentaria: infección transmitida por alimentos que se produce por el consumo de alimentos que contienen microorganismos vivos perjudiciales para la salud, como virus, bacterias y parásitos (ANMAT, 2015).
- Toxiinfecciones alimentarias: son originadas por la presencia en los alimentos de gérmenes patógenos que, además de reproducirse, producen toxinas (ANMAT, 2015).

1.9.3 Prevención.

Las ETA son enfermedades generadas por la incorrecta manipulación de los alimentos, especialmente aquellos considerados de mayor riesgo para la salud pública como: carnes, lácteos, pescados y huevos, durante las diferentes etapas desde su producción hasta su

consumo, es por ello que debemos realizar acciones para prevenir estas enfermedades garantizando el cumplimiento de las normas básicas de higiene (PAE, 2016):

- Higiene personal: son las conductas de higiene o limpieza que se deben realizar permanentemente.
- Higiene de los alimentos: todas las medidas que se aplican para producir, distribuir y almacenar un alimento en buenas condiciones higiénicas.
- Higiene del entorno: la limpieza y desinfección del área de preparación es fundamental, cuidando el buen estado de las materias primas y la higiene de los manipuladores.
 - Se debe limpiar y desinfectar los pisos, paredes y superficies de trabajo.
 - Evitar la generación de polvo en las áreas de manipulación de alimentos.
 - Desinfección y control de plagas.

1.10 Calidad microbiológica del queso.

La producción de queso en Ecuador se encuentra en plena fase de crecimiento en 2017 se produjo 36.260.925 kilos de queso; el de mayor producción fue el amasado, debido a sus aportaciones alimenticias y bajo precio (Pardillos Lara, 2020). Por su incremento en la demanda se han establecido normas para su control y adecuado procesamiento.

El queso se puede producir con leche pasteurizada y sin pasteurizar, siendo esta última la de mayor problema debido a su alta carga microbiana en aerobios mesófilos, mohos y levaduras; además de microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *E.coli* y *Listeria monocytogenes*, provocando enfermedades que pueden llevar hasta la muerte (Yambay, Anhundia, Paredes, & Benavides, 2020). Lo más adecuado es trabajar con leche que cumplió previamente los requisitos de la norma NTE INEN 10 y su procesamiento se realiza de acuerdo a los principios del reglamento de buenas prácticas de manufactura del ministerio de salud pública.

Capítulo dos

(Objetivos)

2.1 General

- Contribuir a la confiabilidad, confidencialidad, exactitud, precisión de resultados del laboratorio UTPL, en cuanto a pruebas microbiológicas en alimentos.

2.2 Específicos

- Implementar y validar el método rápido (petrifilm) para recuento de *Escherichia coli* en queso.
- Implementar y validar el método rápido (petrifilm) para recuento de Enterobacterias en queso.

Capítulo tres

(Materiales y métodos)

3.1 Recolección y preparación de las muestras.

La validación de los métodos se realizó en muestras de queso, la misma fue inoculada a tres rangos de trabajo: alto (1000 – 10000 UFC), medio (100 – 1000 UFC) y bajo (10 – 100 UFC) la densidad bacteriana fue calculada a través de turbidez de acuerdo al índice de McFarland.

Figura 1

Preparación de muestra de queso



3.2 Procedimiento para preparar muestra de referencia.

Preparación de material.

Se preparó Agar Nutriente y Caldo Cerebro Corazón y posteriormente se llevó a esterilización en autoclave junto con el material de vidrio a 121°C, 14 PSI, por un tiempo de 15 minutos.

Siembra de cepas.

Se procedió a abrir el vial liofilizado con la cepa de referencia de *Escherichia coli* ATCC 11775™ y se adicionó 1 mL de Caldo Cerebro Corazón se homogenizó y con una aza de platino se estrió por cuadrantes sobre Agar Nutriente con la finalidad de obtener colonias aisladas. Este procedimiento se realizó en la cámara de flujo laminar de seguridad biológica II. Se incubó las cajas a 37°C por un tiempo de 24 horas.

Figura 2

Siembra de cepa Escherichia coli.



3.3 Procedimiento para crioconservación de cepas.

Crioconservación de cepas.

A partir de un cultivo puro previamente sembrado en Agar Nutriente, se tomó con un hisopo estéril de todas las colonias y se inoculó dentro del crio tubo que contiene glicerol y Caldo cerebro Corazón. Se utilizó el vortex para mezclar y se deja reposar por unos 15 minutos, se etiquetó y crioconservó a -80°C

Figura 3

Crioconservación de cepas.



3.4 Metodología.

Las muestras se determinaron de acuerdo a los métodos oficiales de la Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) para las siguientes bacterias:

- *Escherichia coli*: AOAC official method 991.14.
- Enterobacterias: AOAC official method 2003.01

3.5 Recuento de *Escherichia coli*.

Preparación de material.

Se preparó diluciones con volúmenes de 90 ml y 9 ml con agua Bufferada (ver anexo A). Además, tubos conteniendo de 3 mL de Caldo Nutriente y material de vidrio, posteriormente se esterilizó a 121 °C, 15 PSI por 15 minutos.

Figura 4

Preparación de material.



Procedimiento de siembra.

La cepa bacteriana que se utilizó en la investigación corresponde a la cepa *Escherichia coli* ATCC 11775™ de la colección de la American Type Culture Collection (ATCC), las poblaciones bacterianas se ajustaron a 0.1 de la escala de McFarland con la ayuda de un densitómetro que es un detector de suspensión de turbidez y se mezcló con 100 gramos de queso, se realizó las siguientes concentraciones:

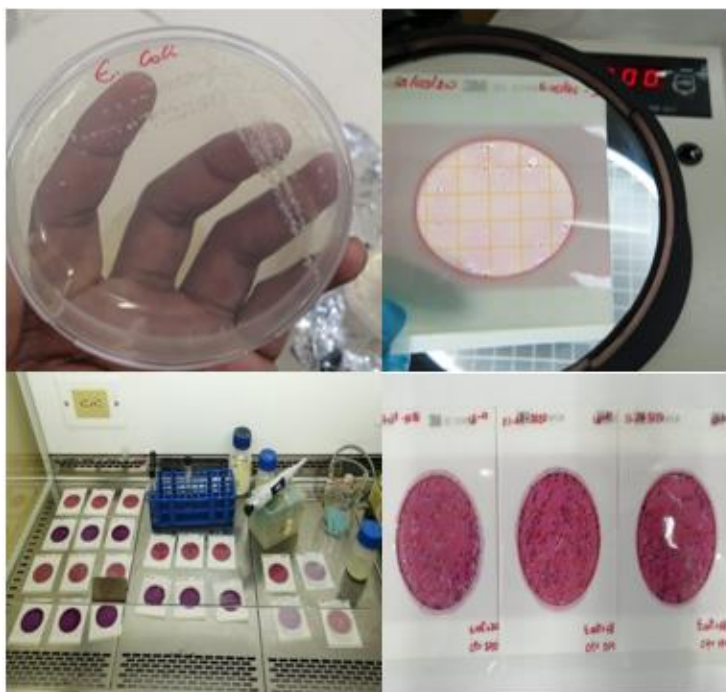
- Baja: de 10-100 UFC/g, se adicionó 50 μ L
- Media: de 100-1000 UFC/g se adicionó 75 μ L
- Alta: de 1000-10000 UFC/g, se adicionó 300 μ L

Se realizaron diluciones consecutivas de 1:10 hasta llegar a la dilución 10^{-6} , se homogenizaron y se sembró por triplicado 1 mL de cada dilución en placas de 3M™ Petrifilm™ Placas Rápidas *E. Coli* / Coliformes. Inmediatamente se dejó caer el film superior de la placa teniendo cuidado de formar burbujas de aire. Se coloca el aplicador con la cara lisa hacia abajo.

Las placas fueron incubadas a $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas. En la figura 5 se aprecia las colonias de *E.coli* sobre las placas petrifilm.

Figura 5

Siembra de *Escherichia coli*



3.6 Recuento de Enterobacterias.

Preparación de material.

Se preparó diluciones con volúmenes de 90 ml y 9 ml con agua Bufferada (ver anexo A). Además, tubos conteniendo de 3 mL de Caldo Nutriente y material de vidrio, posteriormente se esterilizó a 121°C , 15 PSI por 15 minutos.

Procedimiento de siembra.

La cepa bacteriana que se utilizó en la investigación corresponde a la cepa *Escherichia coli* ATCC 11775TM de la colección de la American Type Culture Collection (ATCC), las poblaciones bacterianas se ajustaron a 0.1 de la escala de McFarland con la ayuda de un

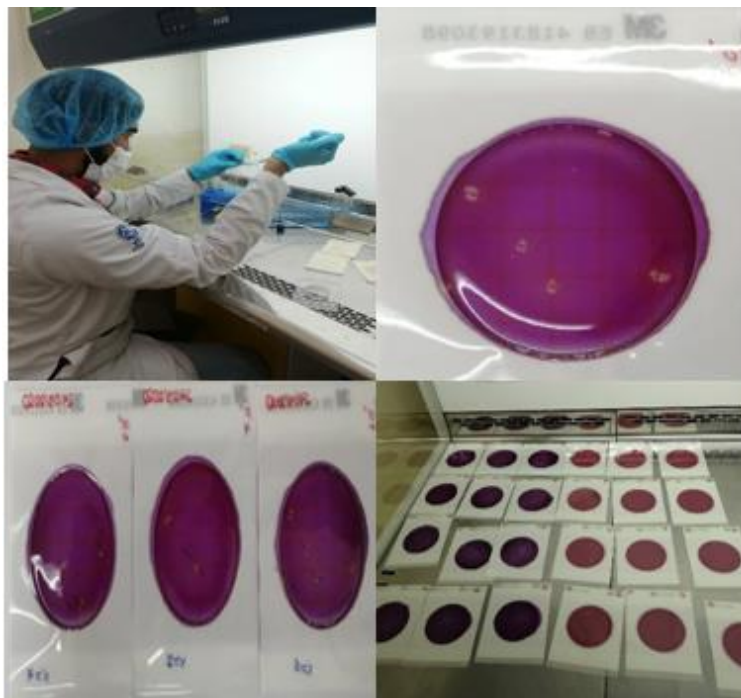
densitómetro que es un detector de suspensión de turbidez y se mezcló con 100 gramos de queso se realizó las siguientes concentraciones:

- Baja: de 10-100 UFC/g, se adicionó 50 μ L
- Media: de 100-1000 UFC/g se adicionó 75 μ L
- Alta: de 1000-10000 UFC/g, se adicionó 300 μ L

Se realizaron diluciones consecutivas de 1:10 hasta la dilución 10^{-6} , se homogenizaron y se sembró por triplicado 1 mL de cada dilución en placas de 3M™ Petrifilm™ Placas para recuento de Enterobacterias. Inmediatamente se dejó caer la parte el film superior de la placa teniendo cuidado para evitar formar burbujas de aire. Se coloca el aplicador con la cara lisa hacia abajo. Las placas se incubaron a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas. En la figura 5 se aprecia la morfología de las colonias de Enterobacterias sobre las placas petrifilm.

Figura 6

Siembra de Enterobacterias.



3.7 Procedimiento de recuperación.

Preparación de material.

Se preparó 100 ml agua peptonada al 1%, se pesó 1 gramo de Peptona de Caseína y se aforó a 100 ml de agua destilada. Se preparó 100 mL de leche en polvo usando 3 gramos de leche en 100 mL de agua destilada. Se esterizaron a 121 °C, 15 PSI por 15 minutos.

Siembra de recuperación.

Se inocula con 1ml de suspensión bacteriana de *E.coli* en un frasco boeco con 99 ml de la preparación de leche, y también de agua peptonada, se realizaron 6 diluciones de 1:10 de la leche inoculada y agua peptonada, posteriormente se sembró en placas Petrifilm para *E.coli* y Enterobacterias. Las placas fueron incubadas por 24 +/- 2 horas a una temperatura de 35°C +/- 1°C. Los recuentos en agua de peptona se consideraron como como valor verdadero y los recuentos en leche fueron los valores de referencia. El conteo se reportó como UFC/ml. En la Figura 7 y 8 se indican las placas con la recuperación de *E.coli*

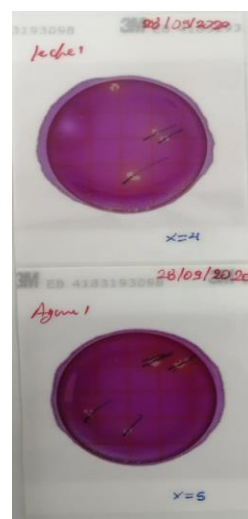
Figura 7

Recuperación de E.coli



Figura 8

Recuperación de Enterobacterias



3.8 Cálculos para parámetros de validación.

Repetibilidad

La Repetibilidad del método se llevó a cabo realizando 3 repeticiones por cada día de siembra en lo que se obtuvieran datos de acuerdo a las poblaciones y cada nivel. Se obtuvo el promedio, desviación estándar y se terminó el criterio de aceptación.

$$CV = \left(\frac{\text{Desviación estandar}}{\text{Promedio}} \right) * 100$$

Reproducibilidad

Se determinó mediante pruebas realizadas por dos analistas, comparando los resultados, obteniendo los logaritmos, el promedio y desviación estándar de cada microorganismo.

$$tc = \frac{X \text{ diferencia } s}{S \text{ diferencia } s}$$

El criterio de aceptación estable que $tc < tt$.

$$tt (9 \text{ gl}, 95\%, 2 \text{ colas}) = 2,262$$

Linealidad

La linealidad del método se terminó con los 3 niveles de cada microorganismo, se obtuvo los logaritmos y se procedió a graficar para determinar la pendiente junto con el coeficiente de correlación (Observar tablas 3 y 4).

Limites

Para determinar los límites de detección y cuantificación se emplearon las siguientes formulas:

Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n \sum xy - (\sum x)(\sum y))^2}{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = \beta_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} = \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Fórmula para el límite de detección

$$LD = \frac{3.3 \times S_b}{b_1}$$

Capítulo cuatro

(Resultados y discusiones)

4.1 Resultados experimentales.

Tabla 1

Datos experimentales de tres niveles de E.coli.

<i>Escherichia coli</i>				
Días	Repeticiones			Promedio
	1	2	3	
10 - 100 (Nivel III)				
1	1,30	1,48	1,60	1,46
2	1,30	1,00	1,30	1,20
3	1,69	1,48	1,70	1,62
4	1,70	1,60	1,84	1,71
5	1,60	1,48	1,60	1,56
6	1,30	1,60	1,00	1,30
7	1,30	1,78	1,70	1,59
100 - 1000 (Nivel II)				
1	2,30	2,48	2,30	2,36
2	2,85	2,70	2,85	2,80
3	2,60	2,78	2,78	2,72
4	2,60	2,30	2,00	2,30
5	2,48	2,70	2,48	2,55
6	2,78	2,70	2,78	2,75
7	2,70	2,85	2,70	2,75
1000 - 10000 (Nivel I)				
1	3,60	3,30	3,00	3,30
2	3,18	3,26	3,38	3,27
3	3,15	3,20	3,11	3,15
4	3,85	3,48	3,48	3,60
5	3,23	3,32	3,32	3,29
6	3,60	3,85	3,70	3,72
7	3,70	3,85	3,90	3,82

Tabla 2

Datos experimentales de tres niveles de Enterobacterias.

Enterobacterias				
Días	Repeticiones			Promedio
	1	2	3	
10 - 100 (Nivel III)				
1	1,78	1,85	1,70	1,78
2	1,85	2,00	1,90	1,92
3	1,78	1,30	1,60	1,56
4	1,95	1,78	1,95	1,89
5	1,78	1,95	2,00	1,91
6	1,85	1,70	1,90	1,82
7	1,78	1,90	1,85	1,84
100 - 1000 (Nivel II)				
1	2,23	2,26	2,28	2,26
2	2,00	2,60	2,00	2,20
3	2,20	2,15	2,26	2,20
4	2,30	2,00	2,30	2,20
5	2,63	2,61	2,70	2,65
6	2,70	2,48	2,85	2,68
7	2,53	2,62	2,68	2,61
1000 - 10000 (Nivel I)				
1	4,00	3,95	3,90	3,95
2	3,88	3,96	3,90	3,91
3	3,89	3,85	3,95	3,90
4	3,85	3,95	4,00	3,93
5	3,85	3,30	4,00	3,72
6	3,69	3,63	3,70	3,67
7	3,81	3,79	3,86	3,82

4.2 Linealidad (Proporcionalidad).

Tabla 3

Linealidad de los tres niveles en E.coli

<i>Escherichia coli</i>					
	3,3		2,36		1,46
	3,27		2,8		1,20
	3,15		2,72		1,62
Nivel I	3,6	Nivel II	2,3	Nivel III	1,72
	3,29		2,55		1,56
	3,72		2,75		1,30
	3,82		2,75		1,59

Gráfico 1

Análisis de la linealidad de Escherichia coli, entre el valor objetivo y el resultado experimental.

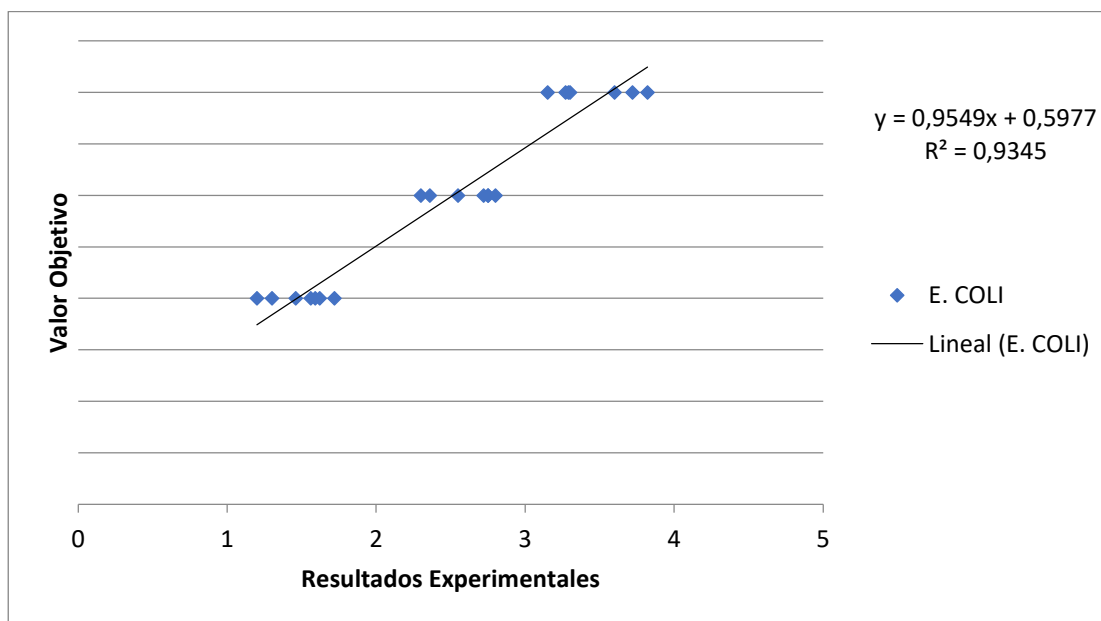


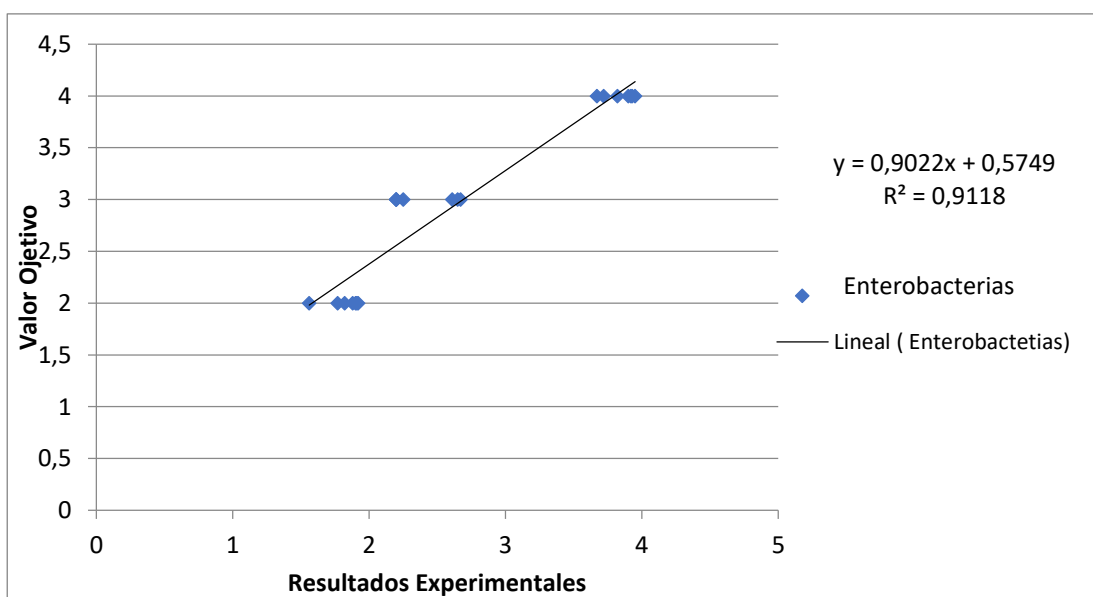
Tabla 4

Linealidad de los tres niveles en Enterobacterias.

Enterobacterias					
	3,95		2,25		1,77
	3,92		2,2		1,92
	3,9		2,2		1,56
Nivel I	3,93	Nivel II	2,2	Nivel III	1,90
	3,72		2,65		1,91
	3,67		2,67		1,82
	3,82		2,61		1,88

Gráfico 2

Análisis de la linealidad de Enterobacterias, entre el valor objetivo y el resultado experimental.



4.3 Validación del rango de trabajo.

Tabla 5

Rango de trabajo de los tres niveles de E.coli.

Escherichia coli		
Nivel	Ufc/ g	
	Mínimo	Máximo
1	1000	8000
2	100	700
3	10	70

Tabla 6

Rango de trabajo de los tres niveles de Enterobacterias.

Enterobacterias		
Nivel	Ufc/g	
	Mínimo	Máximo
1	2000	10000
2	100	700
3	20	100

4.4 Límite de detección y límite de cuantificación.

Tabla 7

Límite de detección y cuantificación de Escherichia coli.

Y	X	X	X
Valor objetivo UFC/g	Valor objetivo LOG	Resultado experimental UFC/g	Resultado experimental LOG
100	2	30	1,48
100	2	17	1,23
100	2	43	1,63
100	2	53	1,72
100	2	37	1,57
100	2	23	1,36
100	2	43	1,63
	Media	35,14	1,52
	Des. Estan	12,58	0,17

Nota: Para obtener el límite de detección y cuantificación se debe emplear el rango más bajo.

Tabla 8

Límite de detección y cuantificación de unidades formadoras de colonias

(UFC) en E.coli

	UFC
Límite de detección	35
Límite de cuantificación	2,03378034

Tabla 9

Límite de detección y cuantificación de Enterobacterias.

Y	X	X	X
Valor objetivo UFC/G	Valor objetivo LOG	Resultado experimental UFC/g	Resultado experimental LOG
100	2	30	1,77
100	2	17	1,92
100	2	43	1,56
100	2	53	1,90
100	2	37	1,91
100	2	23	1,82
100	2	43	1,88
Media		35,14	1,82
Des. Estan		12,58	0,13

Nota: Para obtener el límite de detección y cuantificación se debe emplear el rango más bajo.

Tabla 10

*Límite de detección y cuantificación de unidades formadoras de colonias
(UFC) en Enterobacterias.*

	UFC
Límite de detección	35
Límite de cuantificación	2,20654228

4.5 Exactitud del método por cada nivel y una gráfica.

Tabla 11

Carta de control para los tres niveles en E.coli

Muestra control	ATCC 11775
Método	AOAC 991.14
Análisis	<i>E.coli</i>
Unidad	UFC/g

Tabla 12

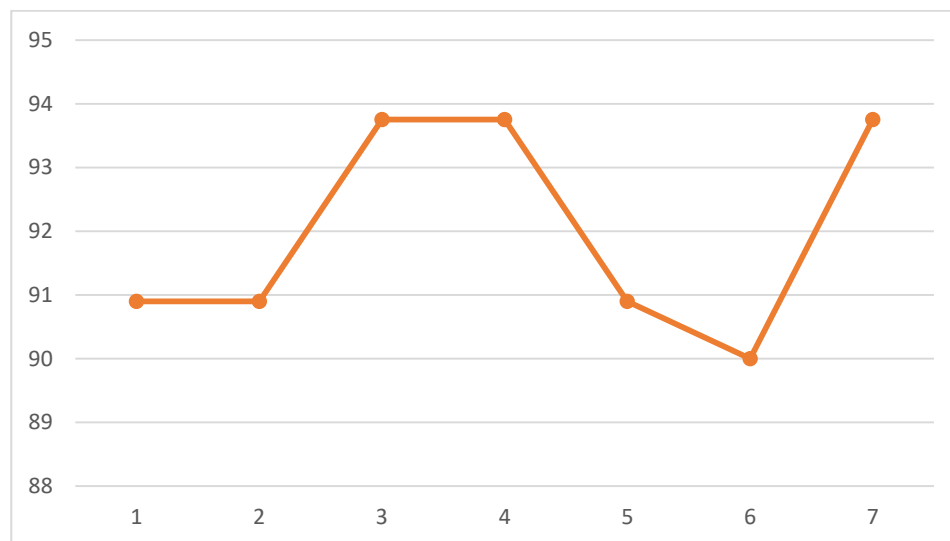
Porcentajes de recuperación del primer nivel en E.coli.

Fecha	Resultado	Responsable
5/8/2020	90,90%	
5/8/2020	90,90%	
5/8/2020	93,75%	
5/8/2020	93,75%	Paul Cajilima
6/8/2020	90,90%	
6/8/2020	90,00%	
6/8/2020	93,75%	

Tabla 13

Exactitud en E.coli primer nivel

Repeticiones	<i>E.coli</i>	%R
1	3,3	90,90%
2	3,27	90,90%
3	3,15	93,75%
4	3,6	93,75%
5	3,29	90,90%
6	3,72	90,90%
7	3,82	93,75%
C.M.C	3,45	92,12%

Grafico 3*Exactitud del primer nivel en E.coli***Tabla 14***Porcentajes de recuperación del segundo nivel en E.coli.*

Fecha	Resultado	Responsable
11/9/2020	109,10%	
21/9/2020	90,00%	
21/9/2020	90,00%	
22/9/2020	83,33%	Paúl Cajilima
22/9/2020	83,33%	
23/9/2020	94,11%	
23/9/2020	94,11%	

Tabla 15*Exactitud en E.coli segundo nivel*

Repeticiones	E.coli	%R
1	2,36	109,10%
2	2,8	90,00%
3	2,72	90,00%
4	2,3	83,33%
5	2,55	83,83%
6	2,75	94,11%
7	2,75	94,11%
C.M.C	2,60	90,9

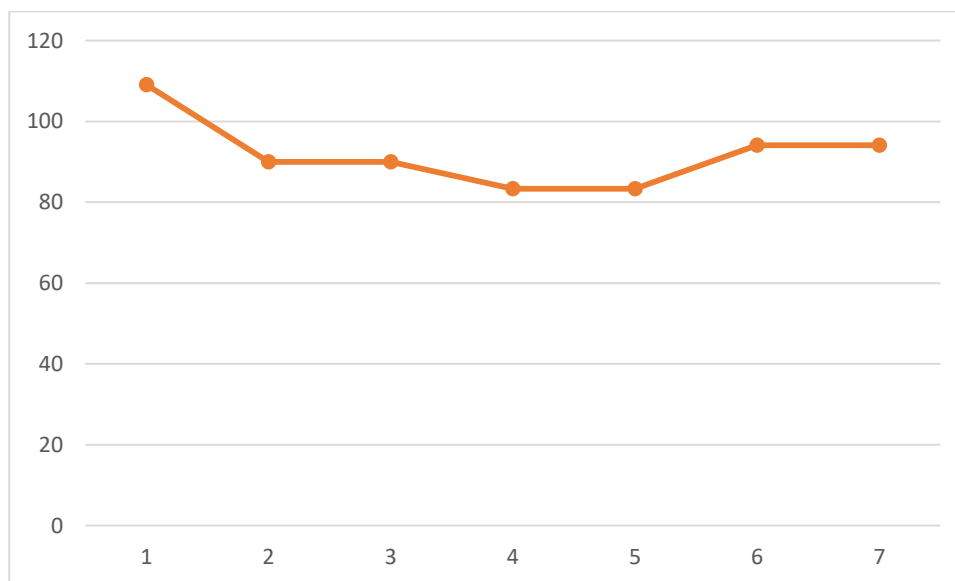
Grafico 4*Exactitud del segundo nivel E.coli*

Tabla 16

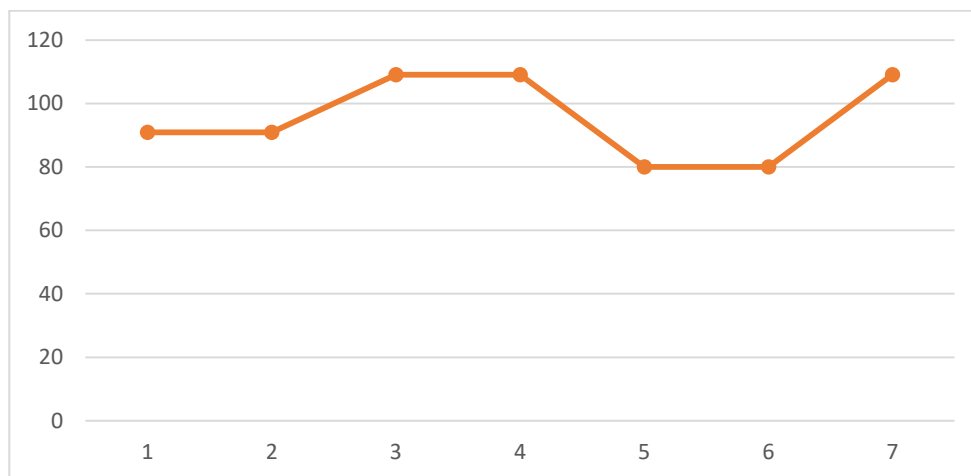
Porcentajes de recuperación del tercer nivel en E.coli.

Fecha	Resultado	Responsable
10/9/2020	90,90%	
10/9/2020	90,90%	
11/9/2020	109,10%	
11/9/2020	109,10%	Paúl Cajilima
17/9/2020	80,00%	
17/9/2020	80,00%	
18/9/2020	109,10%	

Tabla 17

Exactitud en E.coli tercer nivel

Repeticiones	E.coli	%R
1	1,46	90,90%
2	1,2	90,90%
3	1,62	109,10%
4	1,71	109,10%
5	1,56	80,00%
6	1,3	80,00%
7	1,59	109,10%
C.M.C	1,49	95,59%

Grafico 5*Exactitud del tercer nivel E.coli.***Tabla 18***Carta de control para los diferentes niveles en Enterobacterias*

Muestra control	ATCC 11775
Método	AOAC 2003.01
Análisis	Enterobacterias
Unidad	UFC/g

Tabla 19*Porcentajes de recuperación del primer nivel de Enterobacterias.*

Fecha	Resultado	Responsable
1/9/2020	81,81%	
1/9/2020	81,81%	
1/9/2020	81,81%	
1/9/2020	81,81%	Paúl Cajilima
3/9/2020	75,00%	
3/9/2020	75,00%	
3/9/2020	75,00%	

Tabla 20

Exactitud de Enterobacterias primer nivel

Repeticiones	Enterobacterias	%R
1	3,95	81,81%
2	3,92	81,81%
3	3,9	81,81%
4	3,93	81,81%
5	3,72	75,00%
6	3,67	75,00%
7	3,82	75,00%
C.M.C	3,84	78,89%

Gráfico 6

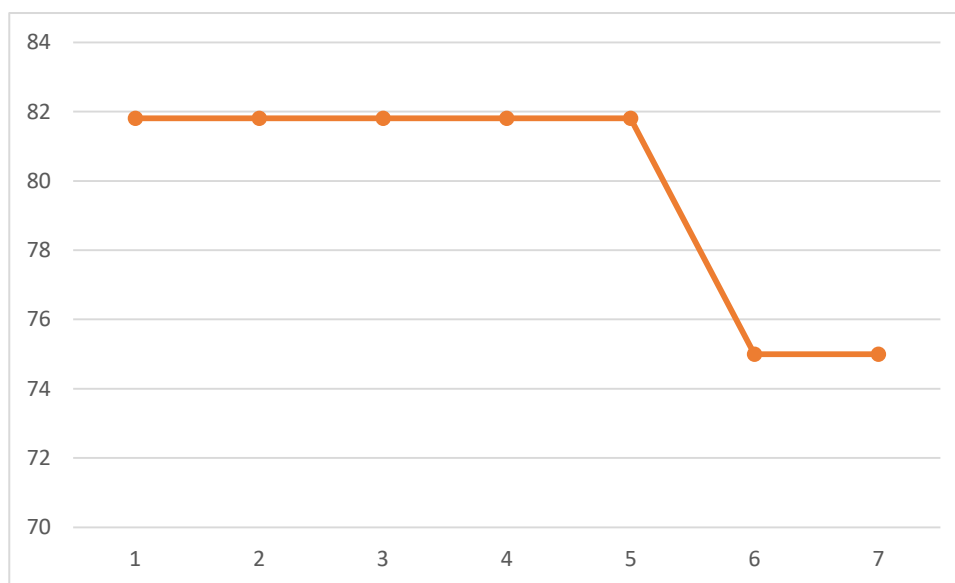
Exactitud del primer nivel Enterobacterias.

Tabla 21

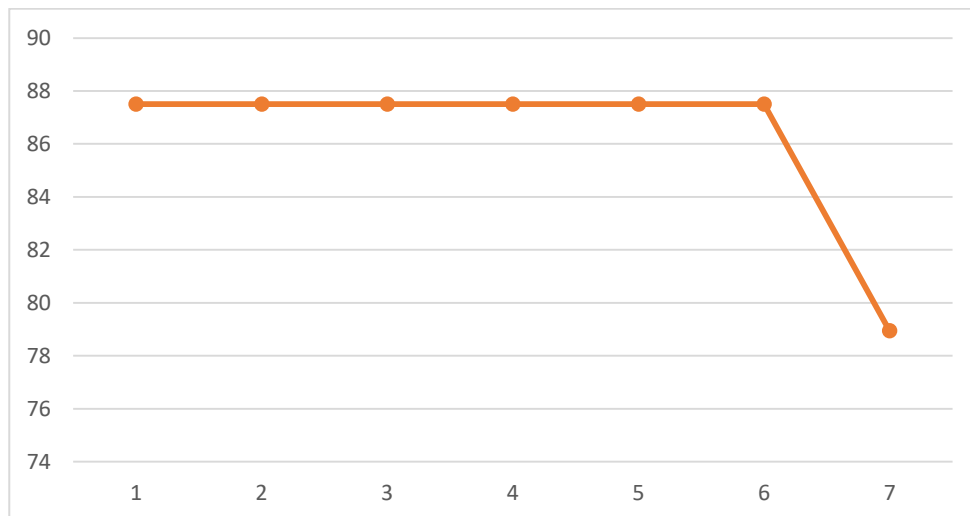
Porcentajes de recuperación del segundo nivel de Enterobacterias.

Fecha	Resultado	Responsable
11/9/2020	87,50%	
11/9/2020	87,50%	
11/9/2020	87,50%	
11/9/2020	87,50%	Paúl Cajilima
11/9/2020	87,50%	
11/9/2020	87,50%	
17/9/2020	78,95%	

Tabla 22

Datos para determinar la exactitud del segundo nivel en Enterobacterias.

Repeticiones	Enterobacterias	%R
1	2,25	87,50%
2	2,2	87,50%
3	2,2	87,50%
4	2,2	87,50%
5	2,65	87,50%
6	2,67	87,50%
7	2,61	78,95%
C.M.C	2,40	86,28%

Gráfico 7*Exactitud del segundo nivel Enterobacterias***Tabla 23***Porcentajes de recuperación del tercer nivel Enterobacterias*

Fecha	Resultado	Responsable
10/9/2020	81,23%	
10/9/2020	81,23%	
24/9/2020	90,90%	
24/9/2020	90,90%	Paul Cajilima
28/9/2020	80,00%	
28/9/2020	80,00%	
28/9/2020	80,00%	

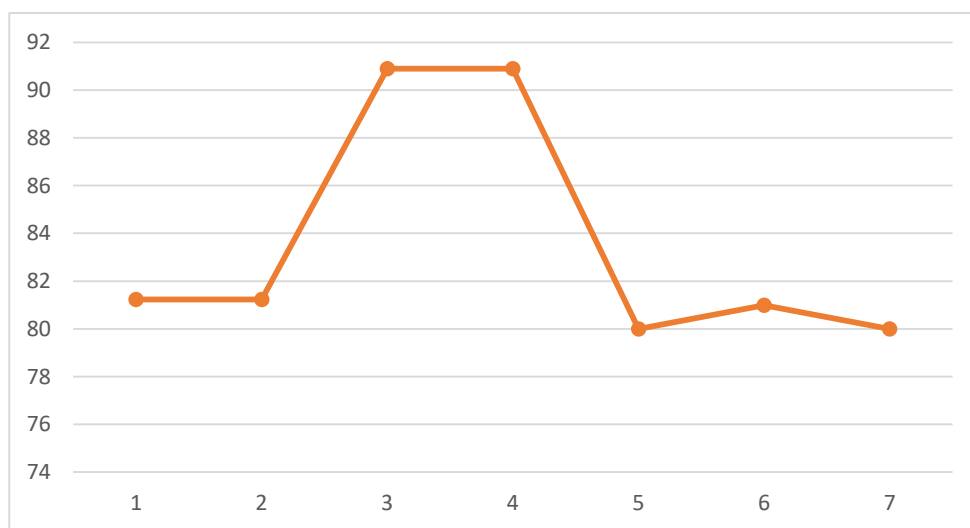
Tabla 24

Datos para determinar la exactitud del tercer nivel en Enterobacterias.

Repeticiones	Enterobacterias	%R
1	1,77	81,23%
2	1,92	81,23%
3	1,56	90,90%
4	1,9	90,90%
5	1,91	80,00%
6	1,82	80,00%
7	1,88	80,00%
C.M.C	1,82	83,47%

Grafico 8

Exactitud del tercer nivel Enterobacterias.



4.6 Precisión del método.

4.6.1 Precisión control.

Tabla 25

Precisión y control en Escherichia coli.

R	<i>Escherichia coli</i>			Rango de
	Resultado experimental			LOG
1	3,60	3,30	3,00	0,6
2	3,18	3,26	3,38	0,2
3	3,15	3,20	3,11	0,09
4	3,85	3,48	3,48	0,37
5	3,23	3,32	3,32	0,09
6	3,60	3,85	3,70	0,25
7	3,70	3,85	3,90	0,2
			Σ	1,8

Tabla 26

Sumatoria de los valores logarítmicos de precisión en *E.coli*

Sumatoria de rangos de Logaritmos	
Σ rango de log/n	0,26
R=	2,306
Precisión control	0,59

Tabla 27*Precisión y control en Enterobacterias*

R	Enterobacterias			Rango de
	Resultado experimental			LOG
1	4,00	3,95	3,90	0,1
2	3,88	3,96	3,9	0,08
3	3,89	3,85	3,95	0,10
4	3,85	3,95	4,00	0,15
5	3,85	3,30	4,00	0,15
6	3,69	3,63	3,70	0,07
7	3,81	3,79	3,86	0,07
			Σ	0,72

Tabla 28*Sumatoria de los valores logarítmicos de precisión en Enterobacterias*

Sumatoria de rangos de Logaritmos	
Σ rango de log/n	0,10
R=	2,306
Precisión control	0,24

4.6.2 Datos y resultados de la Repetibilidad del método.

Tabla 29

Repetibilidad en los tres niveles de E.coli.

	3,3		2,36		1,46
	3,27		2,8		1,20
	3,15		2,72		1,62
I Nivel	3,6	Nivel II	2,3	Nivel III	1,72
	3,29		2,55		1,56
	3,72		2,75		1,30
	3,82		2,75		1,59
Promedio	3,45		2,60429		1,49
Desv.Esta	0,26		0,20387		0,185177
CV	7,51017		7,82815		12,404193
	8%		9%		12%

Tabla 30

Repetibilidad en los tres niveles de Enterobacterias

	3,95		2,25		1,77
	3,92		2,2		1,92
	3,9		2,2		1,56
I Nivel	3,93	Nivel II	2,2	Nivel III	1,90
	3,72		2,65		1,91
	3,67		2,67		1,82
	3,82		2,61		1,88
Promedio	3,844286		2,397143		1,82
Desv.Esta	0,11		0,231640		0,127895
CV	2,884382		9,663175		7,016186
	3%		10%		7%

4.6.3 Reproducibilidad del método.

Tabla 31

Reproducibilidad en E.coli

E.coli			
N	Analista 1	Analista 2	Rango de logaritmos
1	3,49	3,28	0,21
2	3,45	3,2	0,25
3	3,48	3,32	0,16
4	3,32	3,15	0,17
5	3,34	2,95	0,39
6	3,36	2,95	0,41
7	2,95	2,9	0,05
Σ			0,234286
Des.Esta			0,128823

Tabla 32

Reproducibilidad en Enterobacterias

Enterobacterias			
N	Analista 1	Analista 2	Rango de logaritmos
1	3,57	3,38	0,19
2	3,63	3,48	0,15
3	3,73	3,48	0,25
4	3,32	3,0	0,32
5	3,38	3,04	0,34
6	3,4	2,95	0,45
7	3,83	2,9	0,93
Σ			0,38
Des.Esta			0,26

4.7 Incertidumbre del método.

Tabla 33

Incertidumbre en los tres niveles de Escherichia coli

	"Y" Valor objetivo	"X" Resultado experimental		"Y" Valor objetivo	"X" Resultado experimental		"Y" Valor objetivo	"X" Resultado experimental
Nivel I	4	3,3	Nivel II	3	2,36	Nivel III	2	1,46
	4	3,27		3	2,8		2	1,20
	4	3,15		3	2,72		2	1,62
	4	3,6		3	2,3		2	1,72
	4	3,29		3	2,55		2	1,56
	4	3,72		3	2,75		2	1,30
	4	3,82		3	2,75		2	1,59
	Error Típico	0,219756		Error Típico	0,219756		Error Típico	0,219756
	Media datos	3,45		Media datos	2,604285714		Media datos	1,49
	U	6%		U	8%		U	15%

Tabla 34

Incertidumbre de los tres niveles de Enterobacterias

	"Y" Valor objetivo	"X" Resultado experimental		"Y" Valor objetivo	"X" Resultado experimental		"Y" Valor objetivo	"X" Resultado experimental
I Nivel	4	3,95	Nivel II	3	2,25	Nivel III	2	1,77
	4	3,92		3	2,2		2	1,92
	4	3,9		3	2,2		2	1,56
	4	3,93		3	2,2		2	1,90
	4	3,72		3	2,65		2	1,91
	4	3,67		3	2,67		2	1,82
	4	3,82		3	2,61		2	1,88
	Error Típico	0,21975609		Error Típico	0,21975609		Error Típico	0,21975609
	Media datos	3,844285714		Media datos	2,397142857		Media datos	1,82
	U	6%		U	8%		U	15%

Discusión de los resultados.

La validación de métodos microbiológicos se emplea como una herramienta importante para garantizar la inocuidad de los alimentos. Existen diversos métodos microbiológicos de los cuales los laboratorios deben comprobar su adecuación y funcionamiento para llevar a cabo los análisis requeridos; en la tabla 1 y tabla 2 se muestran los resultados logarítmicos obtenidos de la parte experimental de *Escherichia coli* y *Enterobacterias*.

La linealidad es uno de los parámetros que se debe determinar; en el gráfico 1 de *E.coli* se puede observar una linealidad proporcional con una pendiente 0,9549 y un coeficiente de correlación 0,9667; en el gráfico 2 de *Enterobacterias* una pendiente 0,9549 y un coeficiente de correlación 0,9549; el criterio de validación para confirmar la linealidad es un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,90 (Ministerio de Salud Pública de Costa Rica, 2014). Los datos obtenidos demuestran que este valor es consistente con lo que indica la literatura, se cumple con el requisito propuesto (pendiente y coeficiente de correlación, es decir en cuanto a los datos obtenidos tienen relación con el valor objetivo).

En la tabla 5 y tabla 6 se detallan los valores máximos y mínimos obtenidos en unidades formadoras de colonias por cada uno de los tres niveles de *E.coli* y *Enterobacterias*.

Para el límite de detección y cuantificación se emplearon los valores más bajos (tercer nivel), debido a que se debe corroborar que el método realmente detecta los microorganismos a esta concentración. En la tabla 7 se detallan los datos de *E.coli*, donde se obtuvo la media 35,14 y desviación estándar 12,58 en UFC/g y una media de 1,52 con una desviación 0,17 en logaritmos; trabajando con el LDD más bajo, el LDC del nivel más bajo más 3S y las fórmulas (Ver anexo C); se obtuvo un límite de detección de 35 y un límite de cuantificación 2,0338. La tabla 8 detalla los datos de *Enterobacterias*, con una media 35,15 y desviación estándar 12,58 en UFC/g y una media de 1,82 con una desviación 0,13 en logaritmos; empleando el mismo

procedimiento aplicado en *E.coli* se obtuvo un límite de detección 35 y un límite de cuantificación 2,2065.

La exactitud del método se comprobó realizando la carta control que indica la tabla 11 para los tres niveles de *E.coli*. Se realizaron tres repeticiones durante siete días (ver tabla 12, tabla 15 y tabla 18) y se obtuvo un porcentaje promedio de recuperación de 92,12% en el primer nivel; 90,9 del segundo nivel y 95,59% del tercer nivel; en el grafico 3 se puede observar la línea de tendencia del procedimiento de recuperación del primer nivel y posteriormente en el grafico 2 y grafico 3 del segundo y tercero. Para aceptar este porcentaje el promedio debe estar en el intervalo de 75 a 105% (Ortega, Rodriguez, & Zhurbenko, 2013), por lo que los valores obtenidos se encuentran dentro del rango establecido. En Enterobacterias se obtuvo un porcentaje promedio de 78,89% para el primer nivel, 86,28% para el segundo nivel y 83,47% para el tercer nivel. Los porcentajes de cada microorganismo en su nivel correspondiente están dentro de rango de aceptación propuesto es decir se demostró la exactitud del método.

Los datos que se usaron para determinar la precisión y control del método se detallan en la tabla 29 para *E.coli* y tabla 31 para *Enterobacterias*, en ambos casos se trabajó con un nivel de confianza de 95% y a 8 grados de libertad, leyendo un R de 2,306 (ver anexo D); en la sumatoria del rango de logaritmos para el numero de repeticiones se obtuvo 0.26, dando como resultado una precisión de control 0.59 para *E.coli*. La sumatoria de logaritmos para el número de repeticiones en Enterobacterias fue 0.10, al trabajar con el valor R establecido se obtuvo una precisión de control 0.24.

La Repetibilidad del método se determinó calculando el coeficiente de variación de cada uno de los tres niveles; en la tabla 33 se encuentran los datos que se usó en *E.coli*, para el primer nivel se obtuvo un desviación estándar 0.26 y una variación del 8%, para el segundo nivel una desviación de 0.20 con una variación del 9% y el tercer nivel una desviación estándar 0.18 con una variación del 12%. El criterio de aceptación detalla que los porcentajes deben

encontrarse entre 0 – 15% (Ministerio de Salud Pública de Costa Rica, 2014). La tabla 34 detalla los datos para *Enterobacterias*, en el primer nivel se obtuvo una desviación estándar 0.11 con un coeficiente de variación del 3%, para el segundo nivel una desviación de 0.23 y una variación del 10% y tercer nivel una desviación estándar 0.12 y un coeficiente de variación del 7%. En cuanto a repetibilidad se ha cumplido con el criterio de aceptación planteado.

La tabla 35 detalla los datos que obtuvieron los dos analistas para obtener la reproducibilidad en *E.coli*; en la sumatoria de logaritmos se obtuvo 0,2342 con una desviación 0,1288; el análisis estadístico nos arrojó un TC de 1,8186 siendo menor al valor establecido que es de 2,262; esto permite concluir que el método puede ser realizado con éxito en laboratorios distintos al de origen, teniendo en cuenta los demás criterios de validación (FDA, 2019). En la tabla 36 de Enterobacterias se obtuvo un TC de 1,421 siendo menor al valor ya antes mencionado, no se observaron diferencias significativas entre los datos y se cumple con el criterio de que t calculado fue menor al t leído en tabla.

Para determinar la incertidumbre que existe al realizar la detección de *E.coli* se usaron los datos que se presentan en la tabla 37; terminado el análisis estadístico se obtuvo un error típico de 0,219 con una incertidumbre del 6% para el primer nivel, 8% para el segundo y 15% para el tercero; esta estimación caracteriza el intervalo que sitúa los valores dentro de una baja probabilidad de cometer errores (FDA, 2019). Los datos de Enterobacterias se encuentran en la tabla 38, se trabajó con el mismo error típico y se obtuvo una incertidumbre de 6% para el primer nivel, 8% para el segundo y 15% para el tercero; aceptando estos valores. Se comprobó la incertidumbre de los métodos para cada microorganismo en el rango de trabajo correspondiente.

En el proceso de validación el cálculo y análisis de la incertidumbre es de suma importancia ya que permite determinar la capacidad técnica del laboratorio de ensayo y permite comparar mediciones entre sí o con otros valores de referencia que pueden ser obtenidos en especificaciones o normas.

Conclusiones

Los métodos oficiales de la Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) para las siguientes bacterias: *Escherichia coli*: AOAC official method 991.14 y Enterobacterias: AOAC official method 2003.01, fueron aplicados considerando la variabilidad de los microorganismos, ya que pueden alterar el resultado, por lo que para culminar con éxito el proceso de validación se ha requerido: realizar 450 recuentos, aproximadamente 360 horas de siembra y más de 500 horas de trabajo.

Se ha analizado suficientes demostraciones para poder concluir **“Que los métodos se encuentran validados”**.

Recomendaciones

Se recomienda realizar la validación de bacterias patógenas como *Salmonella* y *Listeria monocytógenes* en queso y otros productos lácteos.

Las cepas de referencia deben tener no más de 24 horas para una mejor viabilidad en la preparación de las respectivas concentraciones bacterianas.

Ampliar y ajustar el protocolo propuesto en este trabajo para otros métodos de ensayo y otras matrices alimentarias.

Referencias

- ANMAT. (07 de Febrero de 2015). *Administración nacional de medicamentos, alimentos y tecnología médica. "Enfermedades Transmitidas por alimentos"*. Obtenido de <http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Enfermedades%20transmitidas%20por%20alimentos.pdf>
- AOAC. (1994). AOAC Official Method 991.14 Coliform and Escherichia coli counts in foods.
- AOAC. (2003). AOAC official method 2003.01 enumeration of Enterobacterias in selected foods .
- Cercenado, E., & Cantón, R. (2014). PARÁMETROS DE VALIDACIÓN/VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO. En E. Cercenado, & R. Cantón, *Procedimientos en Microbiología Clínica* (págs. 16-22). Valencia, España .
- Fariñas, M. C., & Luis, M. (2014). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. . *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* , 1-8.
- FDA. (17 de Octubre de 2019). Directrices para la validación de análisis, Métodos para la detección de microbios patógenos en alimentos y piensos. 3 . Obtenido de <https://www.fda.gov/media/83812/download>
- FDA. (17 de Octubre de 2019). Programa de Alimentos Métodos Procesos de Validación y Directrices. *Directrices para la validación de métodos microbiológicos para el Programa de alimentos de la FDA*. Estados Unidos. Obtenido de <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/foods-program-methods-validation-processes-and-guidelines>

- ISO/IEC17025. (15 de Mayo de 2005). Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración.
- ISO/IEC17025. (2005). Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración.
- META. (14 de Octubre de 2015). *Guía para la validación de métodos de ensayo*. Obtenido de Departamento del META: <https://www.meta.gov.co/web/sites/default/files/adjuntos/P-SA-85%20GUIA%20PARA%20LA%20VALIDACION%20DE%20METODOS%20DE%20ENSAYO%20V1.pdf>
- Ministerio de Salud Pública de Costa Rica. (09 de Julio de 2014). Guía de validación de metodos analiticos. Costa Rica. Obtenido de <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos/tramites/registro-de-productos-de-interes-sanitario/medicamentos-1/documentos-de-interes-3/guias-de-registro-medicamentos/2472-guia-de-validacion-de-metodos-analiticos/file>
- OAA. (26 de junio de 2013). Guía para la validación de métodos microbiológicos. *Guía para la validación de métodos microbiológicos*, 1-17. Argentina. Obtenido de <http://www.oaa.org.ar/docs/GUI-LE-05%20v1.pdf>
- OMS. (8 de Diciembre de 2015). *Organización Mundial de la salud "Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria"* . Obtenido de https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/fergonepager_es.pdf?ua=1
- Ortega, M., Rodriguez, C., & Zhurbenko, R. (2013). Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. *Revista cubana de higene y epidemiología*, 111-121.

PAE. (27 de Marzo de 2016). *Ministerio de Educación Nacional de Colombia. Programa de Alimentación Escolar*. Obtenido de MANUAL DE PREVENCIÓN Y NOTIFICACIÓN DE

ETA (Enfermedades Transmitidas por Alimentos):

<https://www.mineducacion.gov.co/1759/articles->

[347771_Manual_Preencion_Notificacion_de_ETA.pdf](https://www.mineducacion.gov.co/1759/articles-347771_Manual_Preencion_Notificacion_de_ETA.pdf)

Pardillos Lara, M. C. (29 de Abril de 2020). El mercado del queso en Ecuador. Quito, Pichincha, Ecuador.

Rodríguez Torrens, H., Sedres Cabrera, M., Bertot Valdés, J., Martínez Saéz, S., & Guevara Viera, G. (2015). Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. *REDVET*, 1 - 28.

SAE. (2007). *Servicio de acreditación Ecuatoriano*. Obtenido de La institución :

<https://www.acreditacion.gob.ec/la-institucion/>

Urzúa, M. (2016). Bacterias patógenas que causan infecciones intestinales. En M. Urzúa, *Microbiología de los alimentos fundamentos y aplicaciones en ciencias de la salud* (págs. 79-81). Guadalajara, Jalisco: Editorial medica panamericana .

Yambay, J., Anhundia, M., Paredes, C., & Benavides, M. (32 de Agosto de 2020). Influencia de las BPM sobre la calidad microbiologica del queso amasado en las PYMES de la

provincia del Carchi, Ecuador. Carchi, Ecuador. Obtenido de

<https://revistas.utm.edu.ec/index.php/Basedelaciencia/article/view/1862>

Apéndices.

Apéndice A. Preparación de reactivos

A 1. Elaboración de Agua Bufferada.

Se debe preparar previamente una solución stock para posterior a esto preparar el agua buferada.

- Preparación de la solución stock: disolver 34 gramos de KH_2PO_4 en 500 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.2 con aproximadamente 1,75 ml de NaOH 1M y aforar 1 litro. Se debe mantener en refrigeración.
- Preparación de Agua Bufferada: tomar 1,25 ml de la solución stock y aforar 1 litro con agua destilada.

Apéndice B. Incertidumbre

B1. Incertidumbre en *Escherichia Coli*.

Estadísticas de la regresión	
Coficiente de correlación múltiple	0,9666942
Coficiente de determinación R ²	0,934497676
R ² ajustado	0,930858658
Error típico	0,217083585
Observaciones	20

Análisis de varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	12,1017449	12,1017449	256,799412	4,2441E-12
Residuos	18	0,84825509	0,04712528		
Total	19	12,95			

	Coficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	0,622506406	0,1531386	4,064986905	0,000726692	0,300774145	0,944238667	0,300774145
3,3	0,939831857	0,05864799	16,02496215	4,2441E-12	0,816616997	1,063046717	0,816616997

B2. Incertidumbre en *Enterobacterias*.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,952067579
Coefficiente de determinación R ²	0,906432674
R ² ajustado	0,90123449
Error típico	0,259454221
Observaciones	20

Análisis de varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	11,7383031	11,7383031	174,374848	1,06539E-10
Residuos	18	1,21169687	0,06731649		
Total	19	12,95			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	0,547423335	0,19096879	2,86655922	0,01025939	0,146212804	0,94863387	0,146212804	0,948633867
	3,95	0,915267301	0,06931162	13,2051069	1,0654E-10	0,769648999	1,0608856	0,769648999

Apéndice C. Fórmulas para determinar el límite de detección y límite de cuantificación.

Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n \sum xy - (\sum x)(\sum y))^2}{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = \beta_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} = \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Fórmula para el límite de detección

$$LD = \frac{3.3 x S_b}{b_1}$$

Apéndice D. tabla estadística de la distribución T de student.

GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0,975}$	GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0,975}$	GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0,975}$
1	12.706	26	2.056	51	2.008
2	4.303	27	2.052	52	2.007
3	3.182	28	2.048	53	2.006
4	2.776	29	2.045	54	2.005
5	2.571	30	2.042	55	2.004
6	2.447	31	2.040	56	2.003
7	2.365	32	2.037	57	2.002
8	2.306	33	2.035	58	2.002
9	2.262	34	2.032	59	2.001
10	2.228	35	2.030	60	2.000
11	2.201	36	2.028	61	2.000
12	2.179	37	2.026	62	1.999
13	2.160	38	2.024	63	1.998
14	2.145	39	2.023	64	1.998
15	2.131	40	2.021	65	1.997
16	2.120	41	2.020	66	1.997
17	2.110	42	2.018	67	1.996
18	2.101	43	2.017	68	1.995
19	2.093	44	2.015	69	1.995
20	2.086	45	2.014	70	1.994
21	2.080	46	2.013	71	1.994
22	2.074	47	2.012	72	1.993
23	2.069	48	2.011	73	1.993
24	2.064	49	2.010	74	1.993
25	2.060	50	2.009	75	1.992