



**UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS EN ALIMENTOS CON
ENSAYOS RÁPIDOS PARA LA APLICACIÓN EN EL LABORATORIO DE
ANÁLISIS Y CONTROL DE CALIDAD DE LA PREFECTURA DE BOLÍVAR.**

Proyecto de Investigación previo a la obtención del Título de Ingeniero Agroindustrial, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente. Carrera de Ingeniería Agroindustrial.

AUTOR:

JOSÉ DAVID MONAR COLOMA

DIRECTOR:

DRA. ODERAY MERINO PEÑAFIEL. MSc.

GUARANDA – ECUADOR

2017

TEMA:
**“VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS EN ALIMENTOS
CON ENSAYOS RÁPIDOS PARA LA APLICACIÓN EN EL LABORATORIO
DE ANÁLISIS Y CONTROL DE CALIDAD DE LA PREFECTURA DE
BOLÍVAR”**

REVISADO Y APROBADO POR:

.....
Dra. ODERAY MERINO PEÑAFIEL. MSc.
DIRECTOR DEL PROYECTO

.....
Dra. MARÍA BERNARDA RUILOVA. PhD
ÁREA DE BIOMETRIA

.....
Ing. SONIA SALAZAR RAMOS. MSc
ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

Yo: JOSÉ DAVID MONAR COLOMA, autor de la tesis declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; este documento no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional y que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas.

La Universidad Estatal de Bolívar puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

.....
José David Monar Coloma

CC: 020232472-9

AUTOR

.....
Dra. Oderay Merino Peñafiel. MSc.

CC: 060086903-6

DIRECTOR

.....
Ing. Sonia Salazar Ramos. MSc

CC: 020093306-7

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

DEDICATORIA

A Dios en primer lugar por brindarme los medios necesarios para continuar mi formación como profesional, a mis padres Julio César Monar y Gladys Natividad Coloma por apoyarme incondicionalmente en toda mi etapa como estudiante, por brindarme siempre su buen ejemplo para seguir adelante, perseverar y poder culminar uno de mis objetivos.

A mis hermanos Javier Monar, Verónica Monar y Julio Monar quienes estuvieron siempre pendientes de mí y apoyándome incondicionalmente.

Al amor de mis dos abuelitas, Ernestina Monar que siempre me empujó a seguir por el buen camino y cumplir mis metas, a Natividad Yáñez que siempre ha velado por mí y ha estado conmigo en toda mi vida estudiantil.

José Monar Coloma

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de investigación dedico a mis padres, por haberme acompañado y guiado a lo largo de toda mi carrera.

A la Universidad Estatal de Bolívar por darme la oportunidad de estudiar y formarme como profesional.

Agradezco a mi tribunal de tesis, Dra. Oderay Merino, Dra. María Ruilova y a la Ing. Sonia Salazar por sus enseñanzas, ayuda y tiempo brindado en el transcurso de esta investigación para mi formación profesional.

A mis padres Julio César Monar y Gladys Natividad Coloma por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y haberme hecho un joven humilde, perseverante y responsable.

A la Ing. Erika Aroca Pinos por las recomendaciones y tiempo dedicado para la culminación de mi trabajo de investigación.

Quiero agradecer a todos los docentes que me brindaron su apoyo y conocimiento en todo el trascurso de mi vida como estudiante y ser humano.

José Monar Coloma

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

PORTADA

CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

AGRADECIMIENTO

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMEN

SUMMARY

CAPÍTULO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. PROBLEMA	3
III. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).....	4
3.2 Validación	5
3.3 Validación de un método microbiológico cuantitativo alternativo	5
3.4 Parámetros establecidos	6
3.4.1 Linealidad:.....	6
3.4.2 Exactitud:	7
3.4.3 Sesgos (Bias):.....	7
3.4.4 Exactitud relativa (AC):	7
3.5 Límites de detección y cuantificación.....	8

3.5.1 Nivel crítico:.....	8
3.6 Sensibilidad relativa y determinación de muestras desconocidas.....	9
3.7 Especificidad, inclusividad y exclusividad.....	10
3.8 Método McFarland.....	12
IV. MARCO METODOLÓGICO.....	13
4.1 Materiales.....	13
4.1.1 Localización de la investigación.....	13
4.1.2 Situación geográfica y climática.....	13
4.1.3 Zona de vida. (zonificación ecológica).....	13
4.2 Material experimental.....	14
4.3 Materiales de campo.....	14
4.4 Equipos y materiales de laboratorio.....	14
4.5 Reactivos.....	15
4.6 Materiales de oficina.....	15
4.7 Métodos.....	16
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
VI. COMPROBACIÓN DE HIPOTESIS.....	34
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	51
ANEXOS.....	53
ANEXO 1.....	53
ANEXO 2.....	54
ANEXO 3.....	57
ANEXO 4.....	61

ANEXO 5.....68
ANEXO 6.....73

ÍNDICE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁG.
Tabla 1.	Localización.....	13
Tabla 2.	Parámetros climáticos del cantón Guaranda.....	13
Tabla 3.	Factores de estudio.....	16

ÍNDICE CUADROS

Cuadro	DESCRIPCIÓN	PÁG.
Cuadro 1.	Resultados pre validación.....	21
Cuadro 2.	Salchichas enlatadas.....	22
Cuadro 3.	Resultados de validación en salchichas enlatadas.....	23
Cuadro 4.	Queso mozzarella.....	24
Cuadro 5.	Resultados de validación en queso mozzarella.....	25
Cuadro 6.	Fideo.....	26
Cuadro 7.	Resultados de validación en fideo.....	27
Cuadro 8.	Arroz.....	28
Cuadro 9.	Resultados de validación en arroz.....	29
Cuadro 10.	Atún en agua.....	30
Cuadro 11.	Resultados de validación en atún en agua.....	31
Cuadro 12.	Leche UHT.....	32
Cuadro 13.	Resultados de validación en leche UHT.....	33
Cuadro 14.	Datos primarios de la validación realizados por el analista 1.....	35
Cuadro 15.	Datos primarios de la validación realizados por el analista 2.....	36
Cuadro 16.	Repetibilidad realizada por el analista 1.....	37

Cuadro 17. Repetibilidad realizada por el analista 2.....	39
Cuadro 18. Reproducibilidad realizada por el analista 1 y 2.....	41
Cuadro 19. Exactitud.....	43
Cuadro 20. Incertidumbre	45

RESUMEN

En la ciudad de Guaranda, Sector Laguacoto, Universidad Estatal de Bolívar, Carrera de Ingeniería Agroindustrial, se realizó el trabajo de investigación que tuvo como objetivo la validación de métodos microbiológicos en alimentos con ensayos rápidos para la aplicación en el laboratorio de análisis y control de calidad de la prefectura de Bolívar, esto permitió establecer métodos microbiológicos en alimentos aplicando placas Compact Dry como ensayos rápidos comparándolos con los métodos de Asociación de Comunidades Analíticas (AOAC), homologando los métodos microbiológicos (*Coliformes totales*, *Escherichia coli*) de alimentos aplicando las placas Compact Dry en el laboratorio de análisis y control de calidad de la prefectura de Bolívar. Así mismo se comprobó la efectividad de Compact Dry como un método de detección y cuantificación eficaz de *coliformes totales* y *Escherichia coli* y se compulsó que las placas Compact Dry para la detección de coliformes totales y fecales en alimentos fue exacto, reproducible y repetible. Dentro de la investigación se aplicó técnicas y procedimientos basados en la norma AOAC 110402, bajo estos principios se realizó la validación de métodos, los cuales nos permitieron determinar a diferentes diluciones de concentración las unidades de colonias formadas en cada una de las muestras alimenticias. En la Repetibilidad obtuvimos los siguientes datos a (\log_{10}): media = 3,45; desviación estándar = 0,037; varianza = 0,001; rsd (%) = 1,07. A (d): media = 0,03; desviación estándar = 0,022 y una varianza de 0,000. Para sumatoria de desviación al cuadrado ($\sum d^2$) = 0,0122. En reproducibilidad se obtuvo como resultado: media total = 3,44; sumatoria = 0,003; varianza = 0,001; desviación estándar = 0,029 y RSD (%) = 0,840. En Exactitud se presentaron los siguientes datos: media = 2,400533977; desviación estándar = 0,047511314; RSD = 1,979197738. Finalmente, en Incertidumbre se obtuvo los siguientes resultados: uc = 0,110; uc % = 11.0 y ue = 0,221; ue% = 22,1; K_2 = 95% confianza. Con todos estos antecedentes, se concluye que la validación de métodos microbiológicos en alimentos con ensayos rápidos fue aceptable y se ajustan a todos los parámetros establecidos.

Palabras Claves: validación, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, linealidad.

SUMMARY

In the city of Guaranda, Sector Laguacoto, State University of Bolivar, Agroindustrial Engineering Career, the research work was carried out with the objective of validating microbiological methods in food with rapid tests for application in the analysis and control laboratory. quality of the prefecture of Bolivar, this allowed to establish the microbiological methods in foods applying Compact Dry plates as quick tests comparing them with the methods of Association of Analytical Communities (AOAC), homologating the microbiological methods (total coliforms, Escherichia coli) of foods applying the Compact Dry plates in the analysis and quality control laboratory of the prefecture of Bolívar. Likewise, the effectiveness of Compact Dry as a method of effective detection and quantification of total coliforms and Escherichia coli was verified and it was confirmed that the Compact Dry plates for the detection of total and fecal coliforms in food was exact, reproducible and repeatable. Within the research, techniques and procedures based on the AOAC 110402 standard were applied. Under these principles, the validation of methods was carried out, which allowed us to determine at different dilutions of concentration the units of colonies formed in each of the food samples. In the Repeatability we obtained the following data at (log10): mean = 3.45; standard deviation = 0.037; variance = 0.001; rsd (%) = 1.07. A (d): mean = 0., 03; standard deviation = 0.022 and a variance of 0.000. To sum square deviation (Σd^2) = 0.0122. In reproducibility, the result was: total mean = 3.44; sum = 0.003; variance = 0.001; standard deviation = 0.029 and RSD (%) = 0.840. In Accuracy the following data were presented: mean = 2.400533977; standard deviation = 0.047511314; RSD = 1.979197738. Finally, in Uncertainty the following results were obtained: uc = 0.110; uc% = 11.0 and ue = 0.221; ue% = 22.1; K2 = 95% confidence. With all these antecedents, it is concluded that the validation of microbiological methods in foods with rapid tests was acceptable and adjusted to all established parameters.

Key words: validation, repeatability, reproducibility, accuracy, linearity.

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

La validación es el proceso instaurado para la obtención de pruebas documentadas, a través de estudios sistemáticos de laboratorio y demostrativos, de que un método de análisis es lo suficientemente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos. El proceso de validación permite el conocimiento de las características de funcionamiento del método y proveer un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo. (Velandia 2008).

Las técnicas microbiológicas en el sector de alimentos, están dirigidas con mayor frecuencia a la detección de microorganismos indicadores de la posible presencia de patógenos o alterantes, los métodos convencionales de detección de microorganismos como la técnica del número más probable (nmp), filtración por membrana, siembra en profundidad o vertido en placa, requieren en primer lugar que el microorganismo objeto del análisis forme una colonia en un medio de cultivo, lo cual implica su preparación, esterilización de material, mano de obra suficiente, periodos de incubación relativamente largos, el empleo de cultivos de enriquecimiento o de recuperación y se debe disponer de equipos necesarios como incubadoras, neveras, autoclave, etc. (Velandia 2008).

Puesto que los procedimientos y técnicas tradicionales son hacendosos y requieren de un mayor tiempo, para evitarlo se han desarrollado numerosas técnicas de recuento rápido y efectivo en las cuales se busca utilizar el menor número de procedimientos y ensayos posibles. Las placas Compact Dry Nissiu microbiología ha respondido a las necesidades únicas de la industria de alimentos y bebidas con soluciones innovadoras para los laboratorios, además está dedicado a ofrecer productos que cumplan con los requerimientos más exigentes entre las organizaciones mundiales de referencia, agencias regulatorias de aprobaciones, y corporaciones multinacionales.

Las placas Compact Dry son una familia de placas listas para usarse, que están diseñadas con el fin de ofrecer ahorro de tiempo, incrementar la productividad, garantizar confiabilidad y mejorar la eficiencia en los procesos. (Velandia 2008).

Este trabajo de investigación consistió en aplicar métodos de ensayos rápidos, los cuales admitieron determinar la presencia de microorganismos en diferentes matrices alimenticias con técnicas de recuento rápido, mediante un estudio técnico y de aprobaciones que permitieron establecer las ventajas y desventajas que ofrece las placas Compact Dry en el análisis microbiológico. Este estudio se efectuó a través de pruebas de laboratorio y el análisis de diferentes muestras de alimento, empleando las técnicas de recuento de microorganismos en placas Compact Dry.

Por esta razón se planteó los siguientes objetivos:

- Establecer métodos microbiológicos de alimentos aplicando las placas Compact Dry como ensayos rápidos comparándolos con los métodos de Asociación de Comunidades Analíticas (AOAC).
- Homologar los métodos microbiológicos (Enterobacterias, *Escherichia coli*) de alimentos aplicando las placas Compact Dry en el laboratorio de análisis y control de calidad de la prefectura de Bolívar.
- Compulsar si los métodos para la detección de Enterobacterias y coliformes fecales en alimentos son exactas, reproducibles y repetibles.

CAPÍTULO II

II. PROBLEMA

La presencia de microorganismos en los alimentos no representa necesariamente un peligro para el consumidor o una calidad inferior en estos productos, tomando en cuenta que la gran mayoría contiene naturalmente levaduras, mohos, bacterias y otros microorganismos inocuos. La mayor parte de los alimentos se convierten potencialmente peligrosos solo después de que se han violado los principios de higiene, limpieza y desinfección. La evidencia de estos riesgos se fundamenta en el análisis de muestras de alimentos en busca de los propios agentes causales o indicadores de una contaminación no admisible. (International Commission on Microbiological Specifications for Foods 1984).

De ahí surge la necesidad de que todas las industrias analicen la calidad microbiológica de sus productos a nivel de las materias primas que usan, que determinen la calidad de todos los procesos de elaboración y por supuesto la calidad del producto final. Los métodos de análisis deben otorgar las bases necesarias para emitir dictámenes sobre la calidad y seguridad microbiológica de los alimentos.

En el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos de la Prefectura de Bolívar, no existe métodos microbiológicos validados, rápidos, confiables, económicos para la prestación de servicios.

En base de lo expuesto el presente estudio se orientó a validar métodos microbiológicos en alimentos con ensayos rápidos para la aplicación en el laboratorio de análisis y control de calidad de la Prefectura de Bolívar.

CAPITULO III

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Las enfermedades que son transmitidas por alimentos dan como resultado una amplia variedad de productos comestibles contaminados por microorganismos patógenos, toxinas o sustancias químicas. La prevención de las enfermedades de transmisión alimentaria depende de la manipulación cuidadosa de los productos crudos y de los productos terminados en la cadena de producción.

Una excelente calidad y vigilancia de los alimentos, se interpreta en un ahorro importante de costos sociales, individuales de los consumidores y de los dueños de las industrias que los producen. Garantizar alimentos inocuos y de calidad ha sido una preocupación constante de quienes intervienen en una cadena de alimentos.(Martín 2009).

La *Escherichia coli*, es el indicador de contaminación fecal, es la principal representante de este grupo. Es una bacteria que integra la micro flora de tracto intestinal del Hombre y de la mayoría de las especies de sangre caliente.

Las especies patológicas de *E. coli* son culpables de síndromes diarreicos tanto en el ser humano como en animales, están divididas en seis grupos distintos, de acuerdo a la manera de provocar las enfermedades, estos grupos son: Entero-patogénicas (EPEC), enterotoxigénicas (ETEC), entero-invasivas (EIEC), entero-hemorrágicas (EHEC), enteroagregativas (EaggEC) y las difusamente adherentes (DAEC), dándose mayor importancia las cuatro primeras.

Los síntomas de enfermedad relacionados con este microorganismo dependen del tipo de *E. coli* presente. La *E. coli* O157:H7 es considerada una de las bacterias más patológicas encontrada en los alimentos y ha sido asociada a la ingestión de carnes y productos cárnicos contaminados.(Espinales 2012).

3.2 Validación

Validar es evidenciar con un alto grado de confianza, a través de evidencia documentada que un proceso determinado producirá de forma consistente productos que reunirán las características de calidad predefinidas. (Carrillo y Lozano 2008).

El proceso de validación arranca con las actividades de pre validación, las mismas que consisten en la recopilación de la información relacionada con el proceso, en la revisión de las evaluaciones de riesgos, la calificación técnica a las instalaciones locativas y a los equipos, existencia de procedimientos para las tareas u operaciones y el entrenamiento a los trabajadores. Posteriormente se elaboran los protocolos en donde se define los objetivos específicos de las evaluaciones a ejecutar, las responsabilidades de cada una de las áreas involucradas en la validación, se establecen las variables de interés que se desean evaluar y el plan de monitoreo respectivo; además, de incluir los criterios de aceptación que no son otra cosa que la comparación de los resultados con los niveles permisibles o los resultados esperados. (Carrillo y Lozano 2008).

3.3 Validación de un método microbiológico cuantitativo alternativo

Un método cuantitativo es definido por la norma de microbiología de la cadena alimentaria ISO 16140 como un método de análisis, cuya respuesta es la cantidad del mesurando, medido directamente (enumeración en una masa o en un volumen) o indirectamente (absorbancia del color, impedancia, etc.) en una cantidad determinada de muestra. En el control de calidad de aguas y alimentos, su aplicación es esencial, pues permite detectar si el nivel de uno o más microorganismos se encuentra dentro de los rangos permisibles para la declaración de su inocuidad. (Meylín et al. 2013).

La validación en términos cuantitativos se manifiesta a manera de recuentos y son agrupados otros datos tales como: el peso de la muestra, las diluciones seriadas empleadas, el volumen de inóculo, así como los recuentos obtenidos en cada dilución.

Para el estudio de los resultados, se toman en cuenta los recuentos de aquellas placas que tengan 300 unidades formadoras de colonias (UFC) o menos, y se aplica

posteriormente el re cálculo teniendo en cuenta el factor de dilución para obtener los valores finales. De acuerdo a las recomendaciones de las guías de validación de organizaciones, como *Internacional Organization for Standarization (ISO)*, *Nordic System for Validation of Alternative Microbiological Methods (NordVal)*, *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, específico para análisis de aguas, los resultados se transforman a logaritmos de base diez (\log_{10}) para obtener una función lo más cercana a la distribución normal. Este artificio matemático ha sido empleado por varios especialistas en el análisis estadístico de estudios colaborativos desarrollados aproximadamente a partir de la década de los años 80.(Meylín et al. 2013).

3.4 Parámetros establecidos

Según la norma ISO 16140:2003 se deben determinar los siguientes parámetros en la etapa intra-laboratorial:

3.4.1 Linealidad

Habilidad del método, que cuando se utiliza una determinada matriz arroja resultados que están en proporción con la cantidad de analito presente en la muestra, y que aumenta lineal o proporcionalmente.

Esencialmente, se basa en obtener una curva de calibración primaria mediante el método de referencia utilizando varias réplicas de muestras contaminadas naturalmente (ya que en microbiología es difícil contar con materiales de referencia para alcanzar valores conocidos), y crear una curva de calibración final, estableciendo una relación con los resultados obtenidos mediante el método alternativo, y que se conoce como verificación de la calibración. Idealmente, esta debe ser lineal, utilizando iguales escalas en los ejes, con un intercepto nulo y pendiente igual a uno y con buenos estimados de dispersión. (Meylín et al. 2013).

3.4.2 Exactitud:

Concordancia entre los resultados de la prueba y los valores de referencia admitidos. El término exactitud, cuando se aplica a una serie de resultados, involucra una combinación de los componentes al azar y el error sistemático común o sesgo. (Meylín et al. 2013).

3.4.3 Sesgos (Bias):

Disconformidad entre los resultados esperados y los valores de referencia admitidos. Es el error total sistemático en contraste con el error aleatorio. Puede haber uno o más errores sistemáticos que contribuyan a los sesgos. Una gran diferencia sistemática a partir de los valores de referencia aceptados se refleja en un elevado valor de sesgo. (Meylín et al. 2013).

3.4.4 Exactitud relativa (AC):

Grado de correspondencia entre las respuestas alcanzadas a través de los métodos de referencia y alternativo en muestras idénticas (definido de igual manera para los métodos cualitativos).

Para la medición de los parámetros anteriores, existen requisitos para el diseño del experimento. En la confección de la curva de calibración se necesitan cinco niveles diferentes en cada alimento. Los niveles escogidos deben englobar todo el rango de interés, incorporando un nivel cero (ausencia), central y máximo y dos niveles intermedios. No obstante, *S.L. Scotter* y otros en el año 2001, así como *M.L. De Buyser* y otros en el 2003, en sus estudios de validación de métodos estándares para la detección y enumeración de *Listeria* y enumeración de estafilococos coagulasa-positivos en alimentos, respectivamente, utilizaron solamente cuatro niveles, incluyendo el nivel cero. (Meylín et al. 2013).

La preferencia la tienen las muestras naturalmente contaminadas, no obstante, en ausencia de estas, se pueden emplear las artificialmente inoculadas. Fueron utilizadas cápsulas que contenían *Clostridium perfringens* por *Schulten* y un colectivo de

autores, para la contaminación artificial de queso, carne y alimento animal. De igual manera, *Hanne Rosenquist* y otros en el año 2007 contaminaron artificialmente muestras de diferentes alimentos con cepas de *Campylobacter* termotolerantes liofilizadas. (Rosenquist et al. 2007).

Para obtener un óptimo diseño de análisis de regresión, se debe escoger un rango superior y apropiado de concentraciones de analito. Los resultados repetitivos pueden ser eliminados, o no tener en cuenta las muestras con recuentos similares. En el proceso específico de matrices líquidas, el rango puede ser obtenido por dilución.

Para la elaboración del gráfico se utiliza el eje (vertical) para el método alternativo, y el eje X (horizontal) para el método de referencia. Los puntos a cada nivel deben formar una agrupación discreta. Posteriormente se examina de manera visual el gráfico para revelar puntos aberrantes (obviamente fuera del cúmulo), descartando temporalmente los resultados y examinando cuidadosamente los puntos. Sin embargo, se conoce que los datos no siempre muestran una distribución normal (sino Gausiana), así que el rechazo de resultados resulta controversial teniendo en cuenta si refleja realmente la realidad de la posible variabilidad del método, además que reduce el número de valores para el análisis estadístico. (Meylín et al. 2013).

El estándar de la norma ISO 16140 introduce un análisis estadístico robusto que tiene la ventaja a ser menos sensible a valores extremos. En el año 2006 se describieron técnicas para la aplicación de métodos robustos en el análisis de estudios colaborativos, utilizando datos cuantitativos, y convirtiendo sus datos artificialmente generados de igual manera. (Hedges y Jarvis 2006).

3.5 Límites de detección y cuantificación

3.5.1 Nivel crítico

Medida menor que puede ser detectada (no nula), pero no cuantificable como nivel exacto. Por debajo de este valor no se puede estar seguro de que el verdadero valor no es nulo.

El límite de detección (LOD) es mayor que el nivel crítico porque implica, en términos estadísticos, el poder $1 - \beta$, la probabilidad de revelar significativamente un valor mayor que el nivel crítico (NC). Por otra parte, el límite de cuantificación (LOQ) puede definirse como la menor cantidad de analito (número de microorganismos), que puede ser medida y cuantificada con precisión y exactitud bajo condiciones experimentales por el método bajo validación. Para los métodos cuantitativos, $LOQ = 10 S_0$ según AOAC.(Feldsine et al. 2002).

3.6 Sensibilidad relativa y determinación de muestras desconocidas

La sensibilidad relativa para los métodos cuantitativos se determina como la habilidad del método para detectar el analito cuando es detectado por el método de referencia en una determinada matriz, a un determinado valor promedio o superior por todo el rango de medición, y que representa la mínima medida de variación (aumento de la concentración de analito X), la cual declama una variación significativa de la señal medida.

La sensibilidad es evaluada para cada valor en el rango de medición, por lo que difiere del límite de detección. Este examen se emplea, como un estimado de la sensibilidad, con el objetivo de ratificar de que los valores proporcionados por el método alternativo no difieren marcadamente de los del método de referencia (menos del 30 % en la diferencia).

El reglamento de medición a emplear es el mismo a utilizar para la determinación de la linealidad. Zhurbenko y otros, en el año 2006, mostraron los valores de la especificidad relativa alcanzados para las cepas de *Salmonella* en alimentos en los

medios CromoCen AGN y agar entérico de Hektoen, agar verde brillante, agar sulfito bismuto y agar XLD, todos de nivel superior al 94 %.(Viera et al. 2009).

3.7 Especificidad, inclusividad y exclusividad

La especificidad es la capacidad del método de medir exactamente un analito específico o su cantidad, dentro de la muestra y sin interferencia de componentes no diana como el efecto de la matriz o el ruido de fondo.

Por otra parte, la selectividad es una medida del grado de no interferencia en presencia del microorganismo diana. Un método es selectivo si puede ser empleado para detectar el analito en estudio y puede garantizar que la señal detectada puede ser solo producto del microorganismo diana. (Meylín et al. 2013).

La norma ISO 16140 plantea que, en microbiología, para los métodos cuantitativos (excepto en los casos del recuento total en placa), la inclusividad y exclusividad se establecen por el análisis de al menos 30 cepas puras positivas (del microorganismo en estudio) y al menos 20 cepas puras negativas (otros microorganismos que causan interferencia respectivamente).

Para el crecimiento del estudio se deben analizar y elegir, luego de un análisis, las cepas puras negativas y positivas que contaminan regularmente cada producto. En el caso de ser empleadas cepas que no provengan de una colección, es necesario llevar a efecto un reconocimiento completo, y es obligatorio registrar el origen real de la cepa proveniente de los alimentos.

Puede ser estudiado como diana o analito, un grupo indefinido de microorganismos (coliformes, levaduras), una familia (Enterobacterias), género (*Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Listeria*), especies (*Enterococcus avium*, *Proteus vulgaris*), o una cepa específicamente (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Typhi*). En el caso de los microorganismos que no son de interés, tendrán prioridad para su selección aquellos que puedan ocasionar interferencia en la respuesta, como, por ejemplo, en un medio de cultivo diseñado para la detección de *Escherichia coli* basado

en su respuesta por actividad enzimática de β -galactosidasa y β -glucuronidasa, que no exista confusión con la respuesta de otro coliforme presente en la muestra. (Meylín et al. 2013).

El margen de inoculación para cada una de las cepas puras es 100 veces mayor que el límite de detección y el ensayo se realiza por duplicado. Los resultados se manifiestan, de manera descriptiva, en lo relativo al límite de detección del microorganismo diana; no se necesitan cálculos. Si al examinar los parámetros inclusividad y exclusividad, encontramos alteraciones teniendo en cuenta los resultados pronosticados, esto afecta directamente la especificidad del método y se evalúa si el método alternativo cumple con las determinaciones del fabricante y con los requerimientos específicos para su uso confiable. Contrastando con este criterio de plasmar los resultados de este ensayo, algunos autores lo expresan en porcentajes. (Rosenquist et al. 2007).

Por otra parte, los métodos para su búsqueda han sido descritos y aprobados por organismos internacionales: Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF), Asociación Americana de Salud Pública (APHA), Administración de Drogas y Alimentos (FDA); Métodos de Análisis Oficiales Internacionales (AOAC) y se han establecido criterios de aceptación y rechazo para lotes de diferentes tipos de alimentos (agua, productos lácteos, carnes y otros) a nivel internacional y en nuestro país, a través de las Normas INEN.

Hoy en día, existen alternativas a los métodos tradicionales que permiten obtener resultados confiables en forma rápida a bajo costo; una de ellas la constituyen los recuentos en placa utilizando películas de agares selectivos rehidratables (Compact Dry™), desarrollados por la compañía Nissu™. La compañía ha diseñado placas para recuento de coliformes (violeta rojo bilis, agentes gelificantes e indicador tetrazolium) y de *Escherichia coli* (violeta rojo bilis, agentes gelificantes, indicador de glucuronidasa y tetrazolium), los cuales permiten obtener resultados en 24 horas, cuya confiabilidad y reproducibilidad han sido comprobados y han recibido la aprobación de la AOAC, Asociación Francesa de Normalización (AFNOR), y también por

el Comité Nórdico de Análisis de Alimentos (NMKL). Aún no se han desarrollado placas específicas para la determinación de coliformes fecales; sin embargo, es necesario disponer de una metodología rápida para detectarlos ya que las Normas INEN para productos procesados contemplan requisitos para estos indicadores de contaminación entérica. La compañía Nissu y la AFNOR sugieren el uso de las placas coliformes para la búsqueda de coliformes fecales; esta propuesta motivó la realización de este estudio, el cual tiene por objetivo evaluar el uso de las placas Compact Dry coliformes para la investigación de coliformes fecales en forma rápida, incubándolas a temperaturas elevadas: $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 horas en estufa con aire circulante según lo recomendado por AFNOR y Nissu TM y a $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, en baño de agua circulante (PBA), comparando ambos resultados con el método tradicional de NMP, en muestras de queso blanco.(Alonso y Poveda 2008).

3.8 Método McFarland

Uno de los primeros usos de la turbidez para el cálculo de poblaciones bacterianas fue en la preparación de vacunas. En 1907 McFarland desarrolló una serie de soluciones de sulfato de bario para calcular aproximadamente el número de bacterias en soluciones de turbidez equivalente, según lo determinado por los recuentos de placa.

La ejecución de pruebas de sensibilidad requiere el uso de inóculos estándar. El patrón 0,5 de McFarland se utiliza para la preparación de inóculos en dilución de agar estandarizado, procedimiento de macro y micro dilución de caldo, de difusión en disco y pruebas de sensibilidad para organismos anaerobios.(Dickinson y Company 2005).

CAPÍTULO IV

4. MARCO METODOLÓGICO

4.1 Materiales

4.1.1 Localización de la investigación

La Validación de Métodos de Ensayo Microbiológicos Alternativos en Alimentos se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis y Control de Calidad de la Prefectura de Bolívar ubicado en la parroquia de Guanujo, cantón Guaranda, provincia de Bolívar.

Tabla 1. Localización

UBICACIÓN	LOCALIZACIÓN
Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Parroquia	Guanujo
Dirección	Vía Ambato Guaranda

Elaborado por: (Monar J, 2017)

4.1.2 Situación geográfica y climática

Tabla 2. Parámetros climáticos del cantón Guaranda

PARÁMETROS CLIMÁTICOS	VALOR
Altitud	2800 m.s.n.m
Longitud	79° 00' 02" Oeste
Latitud	01° 34' 15" Sur
Temperatura Media Anual	13° C
Temperatura Máxima	18° C
Temperatura Mínima	8° C
Humedad	75 %

Fuente: (Estación Meteorológica Laguacoto II, 2017)

4.1.3 Zona de vida. (zonificación ecológica)

La localidad en estudio, corresponden al piso húmedo subtropical. Bosque húmedo seco.(Holdridge 1999).

4.2 Material experimental

Cereales y derivados

- Arroz integral
- Fideo especial

Carne y derivados

- Atún lomititos en agua
- Salchicha vienesa enlatada

Leche y derivados

- Queso mozzarella
- Leche ultrapasteurizada

4.3 Materiales de campo

Placas Compact Dry “Nissui” para recuento de *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *E. Coli*

4.4 Equipos y materiales de laboratorio

- Asas de cultivo
- Autoclave HL-342P, GEMMY CORP, serie 1406823
- Balanza digital AV8101, OHAUS, serie B424694846
- Cabina de flujo laminar BBS-H1800-A, BIOBASE, serie BBS-18H011403003D
- Contador de colonias SC6+, STUART, serie R570001079
- Desecador
- Espátulas

- Incubadora BINDER BD115, serie 18668859794
- Frascos con tapa rosca autoclavable de 250 ml
- Fundas estériles Interscience tipo rollbag
- Gradillas
- Hisopos estériles
- Vortex mix VELP SCIENTIFIC, serie 282534
- Papel absorbente
- Pesa muestras
- Micro pipeta GLASSCO, serie 321022 de 1 ml
- Probetas de 250 ml
- Puntas estériles para pipeta automática de 1 -5 ml
- Refrigeradora marca Mabe
- Tubos de ensayo con tapa rosca autoclavable de 10 ml
- Vasos de precipitación de 250 ml y 500 ml

4.5 Reactivos

- Agua peptona para diluciones.

4.6 Materiales de oficina

- Computadora
- Escritorio
- Esferos
- Flash memory
- Impresora
- Papel de impresión
- Registros

4.7 Métodos

En esta investigación se utilizó 2 tipos de cepas: *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli*, a su vez se prepararon diluciones a diferentes concentraciones, obteniendo así resultados más claros y precisos.

Tabla 3. Factores de estudio

CEPA	DILUCIÓN	DILUCIÓN	DILUCIÓN	DILUCIÓN	DILUCIÓN
Cepa: <i>Enterobacter cloacae subsp. Cloacae</i>	X10 ⁻¹	X10 ⁻²	X10 ⁻³	X10 ⁻⁴	X10 ⁻⁵
Cepa: <i>Escherichia coli</i>	X10 ⁻¹	X10 ⁻²	X10 ⁻³	X10 ⁻⁴	X10 ⁻⁵

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Dentro de la metodología estadística se establecieron las siguientes variables: Repetibilidad, Reproducibilidad, Incertidumbre, en las cuales se calcula media, desviación estándar y varianza obteniendo así los resultados para poder calcular la exactitud de los métodos de validación aplicados.

4.7.2 Preparación de la muestra

- Se recibió la muestra en condiciones estériles.
- Se preparó agua peptonada al 5% de concentración.
- Todos los materiales y utensilios a utilizar se autoclavaron a 121°C.
- En caso de muestra sólida se pesó 10 gramos o 10 ml si la muestra fue líquida.
- Homogenizamos con 90 ml de diluyente (agua peptonada).
- La muestra se agitó manualmente en un arco de 30 centímetros con 25 movimientos de arriba hacia abajo, efectuados en un tiempo de 7 segundos.
- Se realizó diluciones decimales en tubos de ensayo de 10 ml con tapa rosca a concentraciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .

4.7.3 Inoculación

- La placa Compact Dry para Coliformes totales, *E. coli* se colocó en una superficie plana. Luego se levantó la tapa.
- Se descargó 1 ml de muestra sobre el centro de la placa, con la pipeta estéril.
- Finalmente se adjuntó la tapa sobre la placa nuevamente.

4.7.4 Incubación

Se incubó las placas de forma invertida en la incubadora Binder a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Luego se realizó el recuento de las placas cumplido el período de incubación. Después de que la incubación se completó, guardamos las placas en congelación (-15°C) hasta 7 días, esto debe evitarse como una práctica rutinaria. Usamos el contador de colonias SC6+ STUART para enumerar las colonias.

4.7.5 Lectura de resultados

Las placas Compact Dry se contaron en el contador de colonias SC6+ STUART, se realizó el recuento de colonias en un rango contable (hasta 500 colonias), esto se lo hará inmediatamente después del período de incubación.

4.7.5.1 Descripción de las colonias

Los Coliformes aparecieron como colonias rojo/rosa. Los *E-coli* en cambio como colonias azules.

4.7.5.2 Cálculos y expresión de resultados

Se contó las placas que contenían unidades formadoras de colonias (UFC) entre 1 a 300.

Para el cálculo del recuento de Coliformes totales se sumó todas las colonias Coliformes y las *E-coli*, multiplicamos el número total de colonias de Coliformes Totales por placa o el promedio del número de colonias por placa, si se hace por duplicado por el factor de dilución apropiado.

Recuentos estimados del contaje lo realizamos en placas que contengan más de 500 colonias y puedan ser reportados como recuentos estimados, en tales recuentos, se determinó el contaje promedio al menos de 3 o 4 cuadros que correspondían a 1 cm², se sacó el promedio y se multiplicó por 20, ya que el área de crecimiento circular fue aproximadamente de 20 cm² que corresponde al área de siembra de la placa Compact Dry.

Un alto número de colonias de Coliformes totales podrían causar una saturación del área de crecimiento hasta tornarla rojo. Un alto número de colonias de *Escherichia coli* podrían causar una saturación del área de crecimiento hasta tornarse azul morado. Cuando esto ocurre, no se hará conteos estimados, se tendrá que ir a la siguiente dilución y suspensión de ensayo para obtener un contaje más exacto, las colonias podrán ser aisladas para una posterior identificación.

La placa la almacenamos en congelación (temperatura menor o igual a -15 °C) por 7 días, después de la incubación, pero se debe evitar hacer esto como una práctica de rutina.

4.7.6 ACTIVACION DE CEPAS DE REFERENCIA

4.7.6.1 Recepción de cepas

Las cepas de referencia se conservaron entre 2 a 8°C en su envase original sellado de acuerdo a lo indicado por el proveedor.

4.7.6.2 Activacion cepa de referencia – American Type Culture Collection (ATCC).

Las cepas de referencia se reconstituyeron mediante la activación del quick stick, sembrándolas por estrías en el medio de Brain Heart Infusion (BHI) agar Becton Dickinson GmbH, las condiciones de incubación y el procedimiento a seguir fue el siguiente:

- Se tomó el sobre dúo pack Quick stick cerrado del almacenamiento entre 2 a 8°C e inmediatamente sacar un (1) hisopo Quick stick.
- El hisopo Quick stick se equilibró a temperatura ambiente aproximadamente por 30 minutos.
- En la cámara de flujo laminar MB-05 o cerca de un mechero de bunsen, se rompió la parte superior del hisopo Quick stick.
- Ligeramente se agitó sobre la palma de la mano hasta comprobar que se disuelva el carbón y se observe que la solución sea homogénea.
- El hisopo estéril se saturó con el material hidratado y se procedió a inocular por aislamiento en agar Standar Methods (SM) para bacterias y Potato Dextrosa Agar (PDA) para mohos y levaduras previamente rotuladas. Se usó un asa estéril para facilitar el aislamiento de colonias.
- El material hidratado restante se desechó como material biológico peligroso.
- Se incubó a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, en la incubadora Binder, las cajas Petri con SM (Bacterias).
- Las cajas Petri de PDA se incubó por $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 5 días (Mohos y levaduras), en la incubadora Binder.

- Luego de la reconstitución de las cepas de referencia, se realizó un control de calidad con pruebas bioquímicas.
- Las cepas de referencia podrán ser subcultivadas una vez para obtener las cepas de reserva.

CAPITULO V

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las diferentes diluciones de los inóculos de *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli* se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Resultados Pre validación

DILUCIÓN	UNIDADES DE COLONIAS FORMADAS
10^4	Incontable
10^4 Réplica	Incontable
10^3	Incontable
10^3 Réplica	Incontable
10^2	74 ufc
10^2 Réplica	78 ufc
10^1	35 ufc
10^1 Réplica	25 ufc
10^0	7 ufc
10^0 Réplica	4 ufc

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Los valores obtenidos dentro de la validación de métodos microbiológicos para *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli* cumplen los parámetros establecidos bajo la norma AOAC 110402 y son algo similar a los valores obtenidos por (Meylín 2013) existiendo una diferencia no muy significativa. La diferencia pudo darse por la condición y marca de los alimentos.

Resultados de la validación

La información de la muestra de salchichas se presenta en el siguiente cuadro:

Cuadro 2. Salchichas enlatadas.

Tipo de Muestra:	Salchicha
Descripción:	Vienesas La Europea
Lote:	SV70323 B1
Fecha de elaboración:	23-mar-17
Fecha de vencimiento	23-mar-19
Fecha de Toma de Muestra:	04/07/2017
Hora	10:00
Cantidad:	180 g
Condiciones de conservación:	Ambiente
Procedencia:	AKI

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Cuadro 3. Resultados de validación en salchichas enlatadas.

PRODUCTO: SALCHICHAS ENLATADAS											
DILUCIONES -3				DILUCIONES -2				DILUCIONES -1			
COLIFORMES		E. COLI		COLIFORMES		E. COLI		COLIFORMES		E. COLI	
JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA
				227-UFC	234-UFC	230-UFC	222-UFC	26-UFC	28-UFC	22-UFC	16-UFC
				252-UFC	220-UFC	220-UFC	241-UFC	34-UFC	27-UFC	23-UFC	21-UFC
				236-UFC	267-UFC	214-UFC	221-UFC	36-UFC	25-UFC	19-UFC	27-UFC
				241-UFC	234-UFC	215-UFC	234-UFC	33-UFC	30-UFC	22-UFC	27-UFC
				234-UFC	222-UFC	211-UFC	247-UFC	32-UFC	37-UFC	22-UFC	19-UFC
				237-UFC	256-UFC	192-UFC	235-UFC	30-UFC	29-UFC	20-UFC	25-UFC
				253-UFC	245-UFC	220-UFC	228-UFC	31-UFC	37-UFC	21-UFC	23-UFC
				249-UFC	230-UFC	216-UFC	226-UFC	39-UFC	25-UFC	24-UFC	21-UFC
				231-UFC	230-UFC	231-UFC	228-UFC	40-UFC	25-UFC	19-UFC	22-UFC
				219-UFC	246-UFC	230-UFC	218-UFC	30-UFC	27-UFC	28-UFC	23-UFC

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Los valores reportados son muy similares a los obtenidos por (Carrillo 2008) y (LACONAL 2013), ellos encontraron valores de *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli* con una diferencia entre analista no muy significativa menor al 10%. La diferencia entre nuestros valores y los comparados pudo deberse a que son alimentos de diversas marcas.

La información de la muestra de queso mozzarella se presenta en el siguiente cuadro:

Cuadro 4. Queso mozzarella.

Tipo de Muestra:	Queso
Descripción:	Rey Queso Mozzarella
Lote:	JPQ16835811
Fecha de elaboración:	23-jun-17
Fecha de vencimiento	02-ago-17
Fecha de Toma de Muestra:	04/07/2017
Hora	10:00
Cantidad:	800 g
Condiciones de conservación:	Refrigeración
Procedencia:	AKI

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Cuadro 5. Resultados de validación en queso mozzarella.

PRODUCTO: QUESO MOZZARELLA											
DILUCIONES -3				DILUCIONES -2				DILUCIONES -1			
COLIFORMES		E. COLI		COLIFORMES		E. COLI		COLIFORMES		E. COLI	
JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA
				268-UFC	237-UFC	208-UFC	184-UFC	24-UFC	34-UFC	23-UFC	16-UFC
				227-UFC	220-UFC	238-UFC	175-UFC	26-UFC	37-UFC	16-UFC	25-UFC
				233-UFC	221-UFC	190-UFC	197-UFC	17-UFC	31-UFC	26-UFC	22-UFC
				231-UFC	224-UFC	194-UFC	176-UFC	20-UFC	33-UFC	17-UFC	16-UFC
				229-UFC	235-UFC	196-UFC	218-UFC	29-UFC	31-UFC	15-UFC	20-UFC
				224-UFC	238-UFC	202-UFC	206-UFC	30-UFC	29-UFC	19-UFC	11-UFC
				213-UFC	226-UFC	210-UFC	198-UFC	22-UFC	35-UFC	14-UFC	15-UFC
				198-UFC	204-UFC	201-UFC	200-UFC	25-UFC	27-UFC	23-UFC	21-UFC
				206-UFC	221-UFC	202-UFC	198-UFC	20-UFC	33-UFC	16-UFC	13-UFC
				181-UFC	210-UFC	207-UFC	198-UFC	24-UFC	31-UFC	21-UFC	19-UFC

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Los valores reportados son muy similares a los obtenidos por (Carrillo 2008) y (LACONAL 2013), ellos encontraron valores de *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli* con una diferencia entre analista no muy significativa menor al 10%. La diferencia entre nuestros valores y los comparados pudo deberse a que son alimentos de diversas marcas.

La información de la muestra de fideo se presenta en el siguiente cuadro:

Cuadro 6. Fideo.

Tipo de Muestra:	Fideo Especial
Descripción:	Don Vittorio
Lote:	A3PL
Fecha de elaboración:	02-feb-17
Fecha de vencimiento	02-feb-19
Fecha de Toma de Muestra:	04/07/2017
Hora	10:00
Cantidad:	400 g
Condiciones de conservación:	Ambiente
Procedencia:	AKI

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Cuadro 7. Resultados de validación en fideo.

PRODUCTO: FIDEO											
DILUCIONES -3				DILUCIONES -2				DILUCIONES -1			
COLIFORMES		E. COLI		COLIFORMES		E. COLI		COLIFORMES		E. COLI	
JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA
				177-UFC	248-UFC	129-UFC	131-UFC	20-UFC	25-UFC	9-UFC	9-UFC
				185-UFC	250-UFC	137-UFC	122-UFC	23-UFC	28-UFC	8-UFC	15-UFC
				173-UFC	236-UFC	133-UFC	222-UFC	16-UFC	35-UFC	9-UFC	10-UFC
				152-UFC	237-UFC	129-UFC	145-UFC	25-UFC	21-UFC	10-UFC	13-UFC
				178-UFC	246-UFC	128-UFC	119-UFC	31-UFC	29-UFC	8-UFC	14-UFC
				162-UFC	238-UFC	122-UFC	126-UFC	29-UFC	31-UFC	10-UFC	11-UFC
				171-UFC	203-UFC	134-UFC	158-UFC	25-UFC	39-UFC	15-UFC	10-UFC
				124-UFC	213-UFC	148-UFC	130-UFC	24-UFC	29-UFC	10-UFC	5-UFC
				142-UFC	214-UFC	149-UFC	125-UFC	26-UFC	33-UFC	8-UFC	18-UFC
				156-UFC	226-UFC	152-UFC	128-UFC	26-UFC	30-UFC	12-UFC	16-UFC

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Los valores reportados son muy similares a los obtenidos por (Carrillo 2008) y (LACONAL 2013), ellos encontraron valores de *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli* con una diferencia entre analista no muy significativa menor al 10%. La diferencia entre nuestros valores y los comparados pudo deberse a que son alimentos de diversas marcas.

La información de la muestra de arroz se presenta en el siguiente cuadro:

Cuadro 8. Arroz.

Tipo de Muestra:	Arroz
Descripción:	AKI Tipo Flor
Lote:	2343
Fecha de elaboración:	01-may-17
Fecha de vencimiento	01-nov-17
Fecha de Toma de Muestra:	04/07/2017
Hora	10:00
Cantidad:	1 Kg
Condiciones de conservación:	Ambiente
Procedencia:	AKI

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Cuadro 9. Resultados de validación en arroz.

PRODUCTO: ARROZ											
DILUCIONES -3				DILUCIONES -2				DILUCIONES -1			
COLIFORMES		E. COLI		COLIFORMES		E. COLI		COLIFORMES		E. COLI	
JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA
				187-UFC	344-UFC	191-UFC	194-UFC	32-UFC	22-UFC	11-UFC	15-UFC
				197-UFC	271-UFC	201-UFC	224-UFC	34-UFC	35-UFC	20-UFC	21-UFC
				203-UFC	300-UFC	192-UFC	200-UFC	32-UFC	37-UFC	19-UFC	19-UFC
				194-UFC	261-UFC	187-UFC	215-UFC	26-UFC	50-UFC	15-UFC	12-UFC
				188-UFC	290-UFC	204-UFC	194-UFC	32-UFC	30-UFC	18-UFC	25-UFC
				189-UFC	276-UFC	192-UFC	191-UFC	29-UFC	30-UFC	10-UFC	11-UFC
				171-UFC	266-UFC	212-UFC	200-UFC	34-UFC	34-UFC	17-UFC	27-UFC
				180-UFC	257-UFC	181-UFC	191-UFC	22-UFC	41-UFC	19-UFC	8-UFC
				191-UFC	285-UFC	180-UFC	180-UFC	24-UFC	285-UFC	13-UFC	180-UFC
				183-UFC	274-UFC	204-UFC	202-UFC	25-UFC	274-UFC	21-UFC	202-UFC

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Los valores reportados son muy similares a los obtenidos por (Carrillo 2008) y (LACONAL 2013), ellos encontraron valores de *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli* con una diferencia entre analista no muy significativa menor al 10%. La diferencia entre nuestros valores y los comparados pudo deberse a que son alimentos de diversas marcas.

La información de la muestra de atún en agua se presenta en el siguiente cuadro:

Cuadro 10. Atún en agua.

Tipo de Muestra:	Atún
Descripción:	Lomitos en agua
Lote:	LR193-6059W
Fecha de elaboración:	01/05/2017
Fecha de vencimiento	may-21
Fecha de Toma de Muestra:	04/07/2017
Hora	10:00
Cantidad:	180 g
Condiciones de conservación:	Ambiente
Procedencia:	AKI

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Cuadro 11. Resultados de validación atún en agua.

PRODUCTO: ATÚN EN AGUA											
DILUCIONES -3				DILUCIONES -2				DILUCIONES -1			
COLIFORMES		E. COLI		COLIFORMES		E. COLI		COLIFORMES		E. COLI	
JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA
				125-UFC	134-UFC	40-UFC	37-UFC	8-UFC	21-UFC	4-UFC	3-UFC
				129-UFC	144-UFC	43-UFC	54-UFC	13-UFC	18-UFC	5-UFC	2-UFC
				114-UFC	124-UFC	38-UFC	31-UFC	7-UFC	24-UFC	3-UFC	1-UFC
				112-UFC	144-UFC	59-UFC	50-UFC	12-UFC	15-UFC	3-UFC	3-UFC
				128-UFC	112-UFC	38-UFC	46-UFC	6-UFC	12-UFC	2-UFC	4-UFC
				129-UFC	120-UFC	35-UFC	41-UFC	10-UFC	16-UFC	1-UFC	5-UFC
				106-UFC	113-UFC	47-UFC	47-UFC	14-UFC	25-UFC	6-UFC	1-UFC
				103-UFC	106-UFC	43-UFC	38-UFC	9-UFC	20-UFC	5-UFC	6-UFC
				102-UFC	124-UFC	46-UFC	39-UFC	12-UFC	31-UFC	5-UFC	10-UFC
				105-UFC	113-UFC	44-UFC	37-UFC	10-UFC	20-UFC	5-UFC	4-UFC

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Los valores reportados son muy similares a los obtenidos por (Carrillo 2008) y (LACONAL 2013), ellos encontraron valores de *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli* con una diferencia entre analista no muy significativa menor al 10%. La diferencia entre nuestros valores y los comparados pudo deberse a que son alimentos de diversas marcas.

La información de la muestra de leche UHT se presenta en el siguiente cuadro:

Cuadro 12. Leche UHT.

Tipo de Muestra:	Leche
Descripción:	La lechera Entera UHT
Lote:	L 6011682 JA
Fecha de elaboración:	25-abr-17
Fecha de vencimiento	24-oct-17
Fecha de Toma de Muestra:	04/07/2017
Hora	10:00
Cantidad:	1 L
Condiciones de conservación:	Refrigeración
Procedencia:	AKI

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Cuadro 13. Resultados de validación leche UHT.

PRODUCTO: LECHE UHT											
DILUCIONES -3				DILUCIONES -2				DILUCIONES -1			
COLIFORMES		E. COLI		COLIFORMES		E. COLI		COLIFORMES		E. COLI	
JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA	JM	EA
				231-UFC	244-UFC	254-UFC	257-UFC	26-UFC	44-UFC	25-UFC	26-UFC
				215-UFC	260-UFC	244-UFC	230-UFC	24-UFC	34-UFC	22-UFC	27-UFC
				221-UFC	232-UFC	233-UFC	256-UFC	24-UFC	32-UFC	35-UFC	19-UFC
				222-UFC	256-UFC	279-UFC	241-UFC	33-UFC	30-UFC	34-UFC	26-UFC
				216-UFC	258-UFC	247-UFC	145-UFC	28-UFC	32-UFC	36-UFC	22-UFC
				221-UFC	282-UFC	231-UFC	136-UFC	30-UFC	42-UFC	35-UFC	29-UFC
				208-UFC	244-UFC	260-UFC	240-UFC	47-UFC	46-UFC	33-UFC	25-UFC
				213-UFC	276-UFC	239-UFC	222-UFC	34-UFC	35-UFC	25-UFC	25-UFC
				227-UFC	264-UFC	251-UFC	244-UFC	45-UFC	44-UFC	19-UFC	27-UFC
				180-UFC	284-UFC	252-UFC	234-UFC	40-UFC	42-UFC	29-UFC	26-UFC

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Los valores reportados son muy similares a los obtenidos por (Carrillo 2008) y (LACONAL 2013), ellos encontraron valores de *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli* con una diferencia entre analista no muy significativa menor al 10%. La diferencia entre nuestros valores y los comparados pudo deberse a que son alimentos de diversas marcas.

CAPÍTULO VI

VI. COMPROBACIÓN DE HIPOTESIS

H0. Los métodos de ensayo microbiológicos alternativos en alimentos aplicados en el laboratorio de análisis y control de calidad de la prefectura de Bolívar para la detección de coliformes totales y fecales en alimentos no son específicos, exactos, reproducibles y repetibles.

H1. Los métodos de ensayo microbiológicos alternativos en alimentos aplicados en el laboratorio de análisis y control de calidad de la prefectura de Bolívar para la detección de coliformes totales y fecales en alimentos son específicos, exactos, reproducibles y repetibles.

A continuación, en el siguiente cuadro se dan a conocer los cálculos realizados por la Ingeniera Erika Aroca (analista 1) dentro de la validación de métodos microbiológicos para *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli*.

Cuadro 14. Datos primarios de la validación realizados por el analista 1.

MÉTODO NORMALIZADO: AOAC 110402							
MÉTODO INTERNO: PE 01-5.4-MB							
DILUCIÓN , VOL MUESTRA: 10 ml							
	-1	-2	-3				RESULTADO UFC
	0,1	UFC				PROMEDIO	
R1	234	28		280		257	2,6E+03
R2	220	27		270		245	2,5E+03
R3	267	25		250		259	2,6E+03
R4	234	30		300		267	2,7E+03
R5	222	37		370		296	3,0E+03
R6	256	29		290		273	2,7E+03
R7	245	37		370		308	3,1E+03
R8	230	25		250		240	2,4E+03
R9	230	25		250		240	2,4E+03
R10	246	27		270		258	2,6E+03
BLANCO	NINGUNA COLONIA						
	267						

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Dentro del cuadro 14. Datos primarios, el valor de la dilución $\times 10^{-2}$ se multiplicó por 10, el resultado de esta operación se sumó más el valor de la dilución $\times 10^{-1}$ sacando un promedio entre estos valores, este valor se dividió para 0,1 obteniendo el resultado de unidades formadoras de colonias (ufc) expresado en potencia.

A continuación, en el siguiente cuadro se dan a conocer los cálculos realizados por el alumno José Monar (analista 2) dentro de la validación de métodos microbiológicos para *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli*.

Cuadro 15. Datos primarios de la validación realizados por el analista 2.

MÉTODO NORMALIZADO: AOAC 110402							
MÉTODO INTERNO: PE 01-5.4-MB							
DILUCIÓN , VOL MUESTRA: 10 ml							
	-1	-2	-3				RESULTADO UFC
	0,1					PROMEDIO	
R1	227	26		260		244	2,4E+03
R2	252	34		340		296	3,0E+03
R3	236	36		360		298	3,0E+03
R4	241	33		330		286	2,9E+03
R5	234	32		320		277	2,8E+03
R6	237	30		300		269	2,7E+03
R7	253	31		310		282	2,8E+03
R8	249	39		390		320	3,2E+03
R9	231	40		400		316	3,2E+03
R10	219	30		300		260	2,6E+03
BLANCO	NINGUNA COLONIA						
253							

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017).

Dentro del cuadro 15. Datos primarios, el valor de la dilución $\times 10^{-2}$ se multiplicó por 10, el resultado de esta operación se sumó más el valor de la dilución $\times 10^{-1}$ sacando un promedio entre estos valores, este valor se dividió para 0,1 obteniendo el resultado de unidades formadoras de colonias (ufc) expresado en potencia.

Dentro del siguiente cuadro se da a conocer los cálculos realizados por la Ingeniera Erika Aroca (analista 1) para obtener la repetibilidad de la validación de métodos microbiológicos para *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli*.

Cuadro 16. Repetibilidad realizada por el analista 1.

ANALISTA	UFC/g	LOG 10	d	d²	
1	2,6E+03	3,41	0,0106	0,0001	
1	2,5E+03	3,39	0,0314	0,0010	
1	2,6E+03	3,41	0,0081	0,0001	
1	2,7E+03	3,43	0,0060	0,0000	
1	3,0E+03	3,47	0,0508	0,0026	
1	2,7E+03	3,44	0,0156	0,0002	
1	3,1E+03	3,49	0,0673	0,0045	
1	2,4E+03	3,38	0,0403	0,0016	
1	2,4E+03	3,38	0,0403	0,0016	
1	2,6E+03	3,41	0,0089	0,0001	
MEDIA		3,42	0,03	$\sum d^2$	0,0119
DESV STA (SD)		0,036	0,021		
VARIANZA (s²_r)		0,001	0,000		
RSD (%)		1,06			

$t_{Calc} = \frac{\bar{d}}{Sd / \sqrt{n}}$		$t_{calc} =$	4,15	
		$t_{tab} =$	2,26	
	$t_{calc} < t_{tab}$		no	
Desv Est Repetibilidad $SDr = \sqrt{(s^2_r)}$				
		SDr=	0,0363	
Desv Est Relativa de la Repetibilidad $(\%RSD_r) = (SDr / X) * 100$				
		RSDr(%)=	1,1	

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

En el cuadro 16. Repetibilidad, se tomó los resultados de unidades formadoras de colonias (ufc) del cuadro de datos primarios, se sacó el \log_{10} de cada uno de estos valores, luego se tomó una diferencia entre estos resultados y se elevó al cuadrado. Con estos datos se calculó la media, desviación estándar, varianza, luego se determinó t calculada y t tabulada. También se calculó desviación estándar de repetibilidad y desviación estándar de repetibilidad porcentual. Estos valores se utilizaron dentro del cálculo de incertidumbre.

Dentro del siguiente cuadro se da a conocer los cálculos realizados por el alumno José Monar (analista 2) para obtener la repetibilidad de la validación de métodos microbiológicos para *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli*.

Cuadro 17. Repetibilidad realizada por el analista 2.

ANALISTA	UFC/g	LOG 10	d	d²	
2	2,4E+03	3,39	0,0661	0,0044	
2	3,0E+03	3,47	0,0187	0,0003	
2	3,0E+03	3,47	0,0216	0,0005	
2	2,9E+03	3,46	0,0030	0,0000	
2	2,8E+03	3,44	0,0101	0,0001	
2	2,7E+03	3,43	0,0237	0,0006	
2	2,8E+03	3,45	0,0031	0,0000	
2	3,2E+03	3,50	0,0519	0,0027	
2	3,2E+03	3,50	0,0464	0,0022	
2	2,6E+03	3,41	0,0385	0,0015	
MEDIA		3,45	0,03	$\sum d^2$	0,0122
DESV STA (SD)		0,037	0,022		
VARIANZA (s²_r)		0,001	0,000		
RSD (%)		1,07			

$t_{Calc} = \frac{\bar{d}}{Sd / \sqrt{n}}$		$t_{calc} =$	4,15	
		$t_{tab} =$	2,26	
	$t_{calc} < t_{tab}$		no	
Desv Est Repetibilidad $SDr = \sqrt{(s_r^2)}$				
		SDr=	0,0368	
Desv Est Relativa de la Repetibilidad $(\%RSD_r) = (SDr / X) * 100$				
		RSDr(%)=	1,1	

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

En el cuadro 17. Repetibilidad, se tomó los resultados de unidades formadoras de colonias (ufc) del cuadro de datos primarios, se sacó el \log_{10} de cada uno de estos valores, luego se tomó una diferencia entre estos resultados y se elevó al cuadrado. Con estos datos se calculó la media, desviación estándar, varianza, luego se determinó t calculada y t tabulada. También se calculó desviación estándar de repetibilidad y desviación estándar de repetibilidad porcentual. Estos valores se utilizaron dentro del cálculo de incertidumbre.

A continuación, se dan a conocer los cálculos realizados por la Ingeniera Erika Aroca (analista 1) y por el alumno José Monar (analista 2) para obtener la reproducibilidad de la validación de métodos microbiológicos para *Enterobacter cloacae* subsp. *Cloacae* y *Escherichia coli*.

Cuadro 18. Reproducibilidad realizada por el analista 1 y 2.

	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Diferencia	Diferencia ²	Varianza
Réplicas	UFC/g	UFC/g	Log	Log			
1	2,6E+03	2,4E+03	3,41	3,39	0,02	0,001	0,000
2	2,5E+03	3,0E+03	3,39	3,47	0,08	0,007	0,003
3	2,6E+03	3,0E+03	3,41	3,47	0,06	0,004	0,002
4	2,4E+03	2,9E+03	3,39	3,46	0,07	0,005	0,002
5	3,0E+03	2,8E+03	3,47	3,44	0,03	0,001	0,000
6	3,0E+03	2,7E+03	3,47	3,43	0,05	0,002	0,001
7	2,9E+03	2,8E+03	3,46	3,45	0,01	0,000	0,000
8	2,8E+03	3,2E+03	3,44	3,50	0,06	0,004	0,002
9	2,7E+03	3,2E+03	3,43	3,50	0,07	0,005	0,002
10	2,8E+03	2,6E+03	3,45	3,41	0,04	0,001	0,001
	MEDIA		3,43	3,45	0,05	0,00	0,00
	DESV STA		0,01	0,01			
	RSD (%)		0,26	0,35			

NUMERO DE DATOS (n)	10
2 n	20
MEDIA TOTAL	3,44
DESVIOS (SUMATORIA)	0,003
VARIANZA	0,001
DESVIACION ESTANDAR	0,029
RSD (%)	0,840

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

En el cuadro 18. Reproducibilidad, se tomó los resultados de unidades formadoras de colonias (ufc) del cuadro de datos primarios del analista 1 y analista 2, se sacó el \log_{10} de cada uno de estos valores, luego se tomó una diferencia entre estos resultados y se elevó al cuadrado. Con estos datos se calculó la media, desviación estándar, varianza. Estos valores se utilizaron dentro del cálculo de incertidumbre.

Dentro del siguiente cuadro se da a conocer los cálculos realizados por la Ingeniera Erika Aroca (analista1) y el alumno José Monar (analista 2) para obtener la exactitud de la validación de métodos microbiológicos para *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli*.

Cuadro 19. Exactitud.

ANALISTA	ufc/g	log 10
A 1	225	2,3521825
A 2	280	2,447158
MEDIA	252,5	2,400534
DESV STA	27,5	0,0475113
RSD %	10,89108911	1,9791977

Vlog (análisis)	Vlog(referencia)		% RECUPERABILIDAD	Z-SCORE INTERNO
2,352182518	3,24		72,598226	-1,017683
2,447158031	3,24		75,529569	0,9813253
CRITERIOS DE ACEPTACION Y RECHAZO				
PRUEBA	VALOR		CRITERIO	
Z-SCORE	$-2 \leq x \leq 2$		SATISFACTORIO	
	$-3 \leq x \leq 3$		CUESTIONABLE	
	$-3 < x < 3$		INSATISFACTORIO	
% RECUPERABILIDAD	$\geq 70 \%$		ACEPTABLE	
				x

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Observando el cuadro 19. Exactitud se logró evidenciar como la recuperación microbiana es satisfactoria en la prueba de exactitud para el Recuento de *Enterobacter cloacae subsp. Cloacae* y *Escherichia coli*. El porcentaje de recuperación bacteriano debe ser mayor al 70%, el cual se cumple en la prueba realizada al obtener porcentaje de recuperación desde 73% al 76%, los valores obtenidos en esta investigación son bastantes similares a los obtenidos por (Carrillo y Lozano 2008).

A continuación, se dan a conocer los cálculos realizados por la Ingeniera Erika Aroca (analista 1) y por el alumno José Monar (analista 2) para obtener la incertidumbre de la validación de métodos microbiológicos para *Enterobacter cloacae* subsp. *Cloacae* y *Escherichia coli*.

Cuadro 20. Incertidumbre.

FUENTES DE INCERTIDUMBRE					
TIPO A		TIPO B			
PRECISION	RSD	EQUIPOS	U (k=2)	Uc	Unidades
REPETIBILIDAD	0,010621624	BALANZA	0,08	0,04	g
REPRODUCIBILIDAD	0,008402772	MICROPIPETA	0,008	0,004	ml
EXACTITUD	0,019791977	INCUBADORA	0,2	0,1	C

$$U_c = \sqrt{(RSD_r^2 + RSD_R^2 + U_c \text{ Balanza}^2 + U_c \text{ Micropipeta}^2 + U_c \text{ Incubadora}^2)}$$

Uc:	0,110	
Uc (%):	11,0	
INCERTIDUMBRE EXPANDIDA		
$U_e = U_c \times k$		
	Ue (k=2)	0,221
	Ue % (k=2)	22,1
K=2	95 % de confianza	

Fuente: (Investigación de Laboratorio)

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Dentro del cuadro 20. Incertidumbre, se tomó dos tipos de datos, el tipo A son los resultados de cada una de las variables, es decir de repetibilidad, reproducibilidad y exactitud y del tipo B son los datos de los equipos calibrados a través del Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). Con estos datos se calculó la incertidumbre e incertidumbre expandida a un nivel de confianza del 95%.

Al realizar la validación de métodos para cada una de las matrices alimenticias se pudo observar dentro de los resultados una variación de un 10% entre cada analista, lo cual significó que el método aplicado fue óptimo.

A su vez podemos decir que el método cumplió y se encontró dentro de los parámetros de la normativa AOAC 110402, esto lo asumimos debido a que se empezó con una dilución patrón de $\times 10^{-5}$; $\times 10^{-4}$ que reportan unidades de colonias formadas incontables, para lo cual se bajó la concentración de la dilución patrón hasta $\times 10^{-1}$, en las cuales se pudo contabilizar las colonias de forma clara y precisa.

Esto demuestra que el procedimiento que seguimos en la pre validación y validación de métodos microbiológicos con ensayos rápidos fue exacto.

Dentro la repetibilidad obtuvimos como resultado: 0, 010621624. En reproducibilidad se obtuvo como resultado: 0,008402772. En exactitud se obtuvo como resultado: 0, 019791977. Finalmente, en incertidumbre se obtuvo los siguientes resultados: $uc = 0,110$; $uc \% = 11,0$ y $ue = 0,221$; $ue \% = 22,1$; $K_2 = 95\%$ confianza.

Con todos estos antecedentes, confirmamos que la validación de métodos microbiológicos en alimentos con ensayos rápidos, fueron aceptables y se ajustaron a todos los parámetros establecidos por las normas nacionales e internacionales.

CAPÍTULO VII

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Dentro de la validación de métodos microbiológicos en alimentos con ensayos rápidos para la aplicación en el laboratorio de análisis y control de calidad de la Prefectura de Bolívar cumplió con cada uno de los requerimientos establecidos dentro de la normativa INEN 17025 Y AOAC 110402, obteniendo resultados óptimos los cuales garantizó que los métodos aplicados fueron reproducibles, repetibles, exactos.
- Las Placas Compact Dry a relación de otras técnicas de recuento rápido posee un gran número de aprobaciones emitidas por laboratorios de diferentes países, posicionando a Compact Dry a nivel mundial para el análisis de muestras alimenticias, esto emite una mayor credibilidad al usuario final.
- El uso de métodos rápidos en el laboratorio proporcionó varios beneficios, como es el ahorro de trabajo, tiempo, exactitud, precisión y consistencia de los resultados, ahorro del lugar de espacio y almacenamiento, rápida y fácil interpretación microbiológica y disminuyó los gastos del procedimiento en general.
- Al usar Placas Compact Dry se eliminó posibles errores en la preparación de medios de cultivo tradicionales, lo cual disminuyó la variación en los resultados y otorgó una mayor exactitud y credibilidad en los resultados.

- Los métodos y técnicas rápidas estudiadas fueron reproducibles, repetibles, exactos, para el recuento de mesófilos, Enterobacterias, Coliformes totales, *E.coli*, *S.aureus*, hongos y levaduras.
- Existió un nivel alto de relación entre los diferentes ensayos realizados, lo que significa que en las técnicas y métodos de recuento utilizados existió una mudanza menor al 10%.
- No existió diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas y métodos estudiados, para cada matriz alimenticia a un nivel de confianza del 95%.

7.2. RECOMENDACIONES

- Ejecutar pruebas interlaboratorio que admita dar mayor credibilidad y confiabilidad a los resultados que se obtengan mediante estos métodos.
- Es aconsejable para próximas validaciones, ejecutar pruebas bioquímicas y moleculares para identificar los microorganismos utilizados en los ensayos.
- Es recomendable para validar métodos microbiológicos que todos los equipos se encuentren calibrados, así como los materiales y cepas se almacenen en lugares adecuados a temperaturas óptimas.
- Para próximos estudios de validación se deberá tener en cuenta realizar ensayos preliminares con las cepas y medios a utilizar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso, N; Poveda, J. 2008. Investigación comparativa en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm para el análisis de alimentos. 2008: 19-180.
2. Carrillo, E; Lozano, A. 2008. Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar chromocult. Pontificia Universidad Javeriana 2008: 1-82.
3. Dickinson and Company. 2005. Patrón de turbidez BBL preparado McFarland Turbidity Standard No. 0.5. Bd 2005: 3.
4. Espinales, K. 2012. Análisis microbiológico para control cualitativo de carne. 2012: 51.
5. Feldsine, Philip and Abeyta, Carlos and Andrews, WH. 2002. AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. Journal of AOAC International 85(5): 1187-1200.
6. Hedges, AJ; Jarvis, B. 2006. Application of 'robust' methods to the analysis of collaborative trial data using bacterial colony counts. Journal of Microbiological Methods 66(3): 504-511.
7. Holdridge, L. 1999. Determination of world Plant Formations From Simple Climatic Data. New York, s.e., 367-368.
8. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1984. Microorganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico. Zaragoza: Acribia 1984: 1-15.
9. Martín, A. 2009. Evaluación Microbiológica De Alimentos Adquiridos En La Vía Pública En Un Sector Del Norte De Bogotá. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 2009: 9-17.
10. Meylín, L; González, O; Martínez, CCR. 2013. Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas Validation of alternative

methods for the microbiological analysis of food products and water. 51(1): 111-121.

11. Rosenquist, H; Bengtsson, A; Hansen, TB. 2007. A collaborative study on a Nordic standard protocol for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* in food (NMKL 119, 3. Ed., 2007). *International Journal of Food Microbiology* 118(2): 201-213.
12. Velandia, JC. 2008. Validación del método analítico para la cuantificación de bacitracina en el laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica veterinaria. 2008: 22-37.
13. Viera Oramas, DR; Zhurbenko, R; Rodríguez Martínez, C. 2009. Caracterización de un hidrolizado ácido de caseína. s.l., s.e., v.61, 1-10.
14. Laboratorio de Análisis y Control de Alimentos. 2013. Validación de métodos aplicado al área de microbiología.

ANEXOS

ANEXO 1

Mapa de ubicación de la investigación



Elaborado por: (Monar J, 2017)

ANEXO 2



LABORATORY PROFICIENCY TESTING

FOOD MICROBIOLOGY

Trial 88

October 31st – November 11th, 2016

Version 1



PT program leader: Nina Skammelsrud
PT coordinator: Ragnhild Skyrud
Eurofins Food & Feed Testing Norway AS

Nina Skammelsrud
Nina Skammelsrud
nina.skammelsrud@eurofins.no

Ragnhild Skyrud
Ragnhild Skyrud
ragnhild.skyrud@eurofins.no

13.12.2016

Eurofins Food & Feed Testing Norway AS	
Nina Skammelsrud	Ragnhild Skyrud
Mellebakken 50	Ingvald Ystgaards vei 3A
1538 MOSS	7047 TRONDHEIM
Norway	
Tlf. 09440+47 45 130 117	Tlf. 09440+47 94 304 399

Final report for Laboratory Proficiency Testing in Food Microbiology Version 1
Trial: TRIAL91
Laboratory number: 648

oktober 20, 2017

Parameter	Sample	Number results	Your answer	Your answer (log)	Participants' mean (log)	S.d. (log, from all)	Lower tolerance limit (log)	Upper tolerance limit (log)	Your Z-score	Your Zeta-score
Aerobic colony count	A	122	1403	3,15	3,39	0,21	2,74	4,03	-1,12	
	B	121	3033	3,48	3,39	0,24	2,68	4,10	0,37	
	C	120	2350	3,37	3,75	0,32	2,80	4,69	-1,19	
Lactic acid bacteria	A	27			< 1	< 1	< 1	< 1		
	B	29			< 1	< 1	< 1	< 1		
	C	29			3,48	0,46	2,09	4,86		
Cont microorganisms	A	20			3,25	0,26	2,47	4,03		
	B	20			3,19	0,31	2,26	4,12		
	C	20			3,15	0,52	1,60	4,70		
Enterobacteriaceae	A	96	< 10	(false negative)	2,14	0,30	1,24	3,03		
	B	97	< 10	(false negative)	2,10	0,37	1,00	3,20		
	C	96	400	2,60	3,01	0,43	1,71	4,31	-0,93	
Coliform bacteria	A	73	< 10	(false negative)	1,93	0,47	0,53	3,33		
	B	73	< 10	(false negative)	2,02	0,33	1,03	3,01		
	C	72	365	2,56	2,89	0,47	1,49	4,29	-0,70	
Thermot coliform	A	31			< 1	< 1	< 1	< 1		
	B	31			< 1	< 1	< 1	< 1		
	C	31			3,06	0,53	1,47	4,65		
E. coli	A	88	< 10		< 1	< 1	< 1	< 1		
	B	89	< 10		< 1	< 1	< 1	< 1		

Laboratory performance can only be fully assessed when interpreted together with the final report

Eurofins Food and Feed Testing Norway AS
Mjøllebakken 50
1538 MOSS
NORWAY
Tlf. / Tel: (+47) 48180117 / 94504182

Laboratory number: 648										
Parameter	Sample	Number results	Your answer	Your answer (log)	Participants' mean (log)	S.d. (log, from all)	Lower tolerance limit (log)	Upper tolerance limit (log)	Your Z-score	Your Zeta-score
E. coli	C	88	886	2,95	2,95	0,46	1,58	4,31	0,00	
Mould	A	94	560	2,75	2,83	0,20	2,23	3,42	-0,39	
	B	93	638	2,80	2,86	0,20	2,27	3,45	-0,27	
	C	92	< 10		< 1	< 1	< 1	< 1		
Yeast	A	91	< 10		< 1	< 1	< 1	< 1		
	B	90	< 10		< 1	< 1	< 1	< 1		
	C	92	140	2,15	2,59	0,37	1,49	3,69	-1,20	
Bacillus cereus	A	79			2,99	0,33	1,98	3,99		
	B	79			3,01	0,33	2,02	3,99		
	C	77			< 1	< 1	< 1	< 1		

ANEXO 3

Cronograma de actividades pre validación y validación.

Matriz Leche y derivados

ACTIVIDAD	03	04	05	06	07	08	17- 21	24- 28
Verificación de necesidad de insumos	X							
Verificación de Equipos	X							
Compra de muestras de alimentos Leche pasteurizada Queso mozzarella envasado al vacío		X						
Preparación de medios de cultivo			X					
Ejecución de análisis				X				
Lectura de Resultados preliminares					X			
Lectura de Resultados finales						X		
Registro de datos							X	
Evaluación de Datos								X

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Cronograma de actividades pre validación y validación.

Matriz Carne y derivados

ACTIVIDAD	03	04	05	06	07	08	17-21	24-28
Verificación de necesidad de insumos	X							
Verificación de Equipos	X							
Compra de muestras de alimentos Atún lomitos en agua Salchicha pasteurizada		X						
Preparación de medios de cultivo			X					
Ejecución de análisis				X				
Lectura de Resultados preliminares					X			
Lectura de Resultados finales						X		
Registro de datos							X	
Evaluación de Datos								X

Elaborado por: (Monar J, 2017)

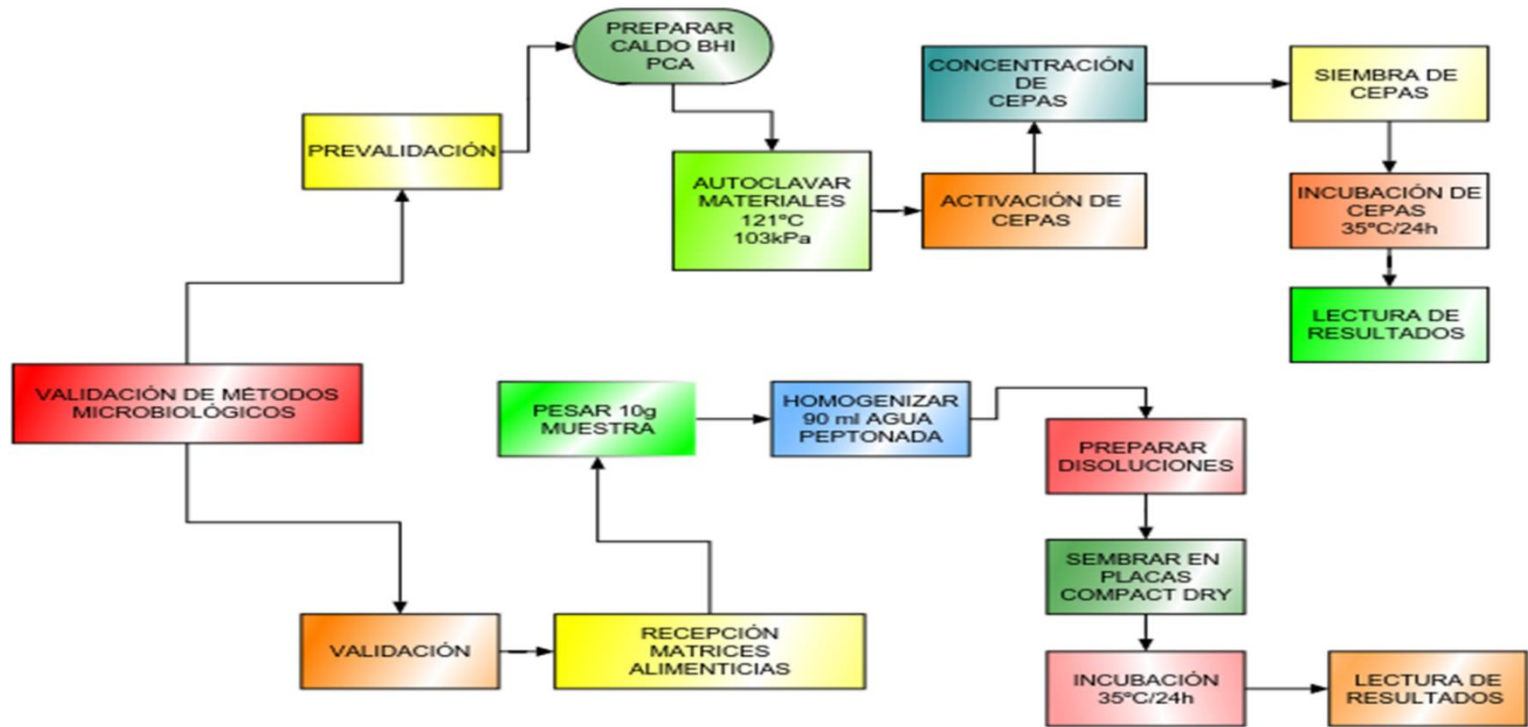
Cronograma de actividades pre validación y validación.

Matriz Cereales y derivados

ACTIVIDAD	03	04	05	06	07	08	17-21	24-28
Verificación de necesidad de insumos	X							
Verificación de Equipos	X							
Compra de muestras de alimentos Arroz integral Fideo especial		X						
Preparación de medios de cultivo			X					
Ejecución de análisis				X				
Lectura de Resultados preliminares					X			
Lectura de Resultados finales						X		
Registro de datos							X	
Evaluación de Datos								X

Elaborado por: (Monar J, 2017)

Diagrama de flujo. (Etapas Validación)



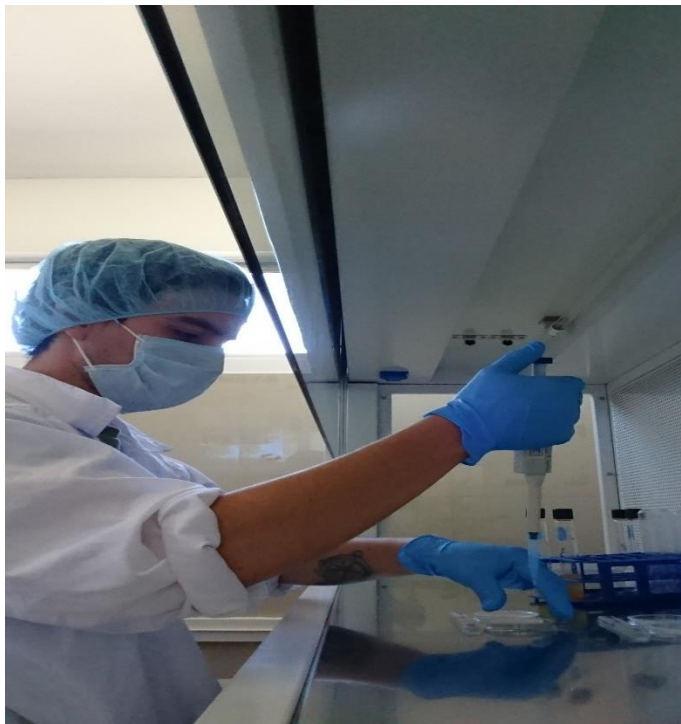
Elaborado por Monar J, 2017

ANEXO 4

Capacitación sobre los métodos de validación



Capacitación sobre el uso, manejo de equipos, medios y materiales dentro de la pre validación y validación de métodos microbiológicos.



PRE VALIDACIÓN

Preparación del caldo BHI y PCA

Pesado de medio de cultivo Brain Heart Infusion (BHI) en gramos



Pesado de medio de cultivo Plate Count Agar (PCA) en gramos

g



Dilución de medios de cultivo BHI Y PCA



Aforado de medios de cultivo BHI Y PCA



Obtención de medios de cultivo BHI Y PCA



Preparación de materiales para auto clavar



Auto clavado de materiales y medios de cultivo BHI y PCA



Preparación de medios de cultivo para activación de cepas



Activación de cepas



Siembra de cepas por estrías



Incubación de cepas a $35 \pm$ por 24 horas



ANEXO 5

Validación

Recepción matriz alimenticias



Aforado de 10 g de muestra en 90 ml de agua peptonada



Determinación de la turbidez de la disolución (Método Mc Farland)



Preparación de diluciones



Siembra de muestras en placas compact dry



Incubado de placas compact dry



Resultados



Lectura de resultados



Lectura de resultados en el contador de colonias Stuart



Análisis de datos



ANEXO 6

Glosario de términos

Desviación negativa: Ocurre cuando el método a validar da un resultado negativo y el valor de referencia es positivo. Una desviación positiva se transforma en un falso negativo cuando se puede demostrar que el resultado verdadero es positivo.

Desviación positiva: Se produce cuando el método a validar da un resultado positivo y el valor de referencia es negativo. Una desviación positiva se transforma en un falso positivo cuando se puede evidenciar que el resultado verdadero es negativo.

Eficacia relativa: Grado de concordancia entre la respuesta obtenida por el método a validar y el valor verdadero obtenido en muestras similares.

Especificidad relativa: Capacidad del método a validar para no detectar el analito cuando no es detectado por el método de referencia.

Exactitud relativa: Grado de concordancia entre un resultado de análisis y el valor de referencia aceptado.

Exclusividad: Ausencia de interferencia en el método de un grupo de cepas no diana.

Inclusividad: Capacidad para detectar el analito entre un amplio grupo de cepas diana.

Límite de cuantificación: La menor cantidad de microorganismos que puede ser medido con una precisión y exactitud definidas.

Linealidad: Aptitud del método para dar resultados que están en proporción con la cantidad de microorganismos presentes en la muestra.

Nivel de detección: Menor número de microorganismos que se pueden detectar en una muestra.

Repetibilidad: Realización de los ensayos en las mismas condiciones (mismo analista, equipos, medios de cultivo...).

Reproducibilidad: Realización de los ensayos en las condiciones más diversas (distinto analista, equipos, días, medios de cultivo...).

Sensibilidad relativa: Capacidad del método a validar de detectar el microorganismo cuando está presente en la muestra a analizar o no diferir de manera significativa del valor de referencia.

Sesgo: Diferencia entre el resultado esperado del análisis y un valor de referencia aceptado.

Validación: Confirmación mediante el examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto.