

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO MEDIANTE EL USO CEPAS ESPECÍFICAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus* EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE UNA EMPRESA ALIMENTICIA

Lesly Thais BECERRA PEÑAFIEL *

Estudiante de la carrera de Procesamiento de Alimentos, Instituto Superior Tecnológico
Juan Bautista Aguirre, Daule, Ecuador

Robert Anthony RONQUILLO ARIA *

Estudiante de la carrera de Procesamiento de Alimentos, Instituto Superior Tecnológico
Juan Bautista Aguirre, Daule, Ecuador

Mariuxi Yomaira OLVERA MORÁN

Departamento de Investigación, Instituto Tecnológico Superior Juan Bautista Aguirre,
Magister en Sistemas Integrados de Gestión, Daule, Ecuador

Jorge Christian PLAZA QUIZHPI

Coordinador de la carrera de Tecnología en Administración de Empresas, Instituto
Superior Tecnológico Juan Bautista Aguirre, Ingeniero en Sistemas Administrativos
Computarizados, Daule, Ecuador

* Autor para correspondencia: lesly1-1998@hotmail.com;
roberth.ronquillo17@gmail.com

RESUMEN

El laboratorio de microbiología requiere ejecutar las validaciones de los métodos analíticos, mediante cepas especializadas en microorganismos específicos e individuales de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, ya que el conocimiento de estas cepas son de importancia en la industria alimenticia. Esta validación se llevó a cabo siguiendo los presentes protocolos y métodos para la determinación de microorganismos, procediendo con la activación de cepas específicas, evaluando el crecimiento microbiano de las colonias (reproductibilidad) y finalmente se contrastaron los resultados de reproductibilidad alcanzados en las diferentes concentraciones del medio de cultivo BPW.

Palabras clave: validación, método analítico, cepas específicas, microbiología, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The microbiology laboratory requires validation of the analytical methods, through strains specialized in specific and individual microorganisms of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, since knowledge of these strains is of importance in the food industry. This validation was carried out following the present protocols and methods for the determination of microorganisms, proceeding with the activation of specific strains, evaluating the microbial growth of the colonies (reproducibility) and finally the reproducibility results achieved in the different concentrations of the medium were checked. BPW culture.

Keywords: validation, analytical method, specific strains, microbiology, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiana, modifica interna y externamente a los productos alimenticios, siendo en algunos casos inaceptables para el consumo humano. Esta problemática, origina grandes pérdidas económicas en las empresas, además de ocasionar que los productos sean eliminados de manera indiscriminada. Este fenómeno es derivado por la contaminación proveniente de bacterias, hongos filamentosos y levaduras, pero ha sido estudiado mayormente en los dos primeros microorganismos mencionados, por su protagonismo en los daños. Aunque el papel de las levaduras es secundario en la contaminación microbiana de los alimentos, las condiciones ambientales tienden a inhibir el crecimiento de bacterias, de tal manera que favorece la aparición de levaduras contaminantes, causantes de afectaciones en los parámetros organolépticos de buena calidad en alimentos frescos, semi-elaborados y elaborados (Orberá, 2004)

Los análisis microbiológicos necesitan ser revisados, evaluados y validados con el fin de demostrar garantía en los resultados mediante el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio, buenas prácticas de análisis, el cumplimiento de los estándares de análisis, control de equipos de medición e incubadoras, además de identificar y especificar los elementos que puedan interferir desde el inicio del proceso hasta el final del mismo (lectura de resultados, prueba de confirmación etc.).

Estas validaciones no solo permiten mantener la garantía de los resultados, también consiente al analista encontrar mejoras en el proceso que puedan generar optimización de tiempo, calidad de preparación y almacenamiento de medios, trazabilidad de análisis, lo cual aporta a la mejora continua como parte de la política de calidad. Este proceso de validación es necesario para la acreditación nacional ya que es un punto mandatorio por la NORMA ISO 170025:2017.

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas de que el método es lo suficientemente fiable para producir el resultado esperado. Los parámetros que pueden ser considerados en la validación de un método analítico son: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, tolerancia y robustez (Herrera, García, & Méndez, 2008).

La validación no es más que la confirmación mediante la contribución de realidades objetivas de datos que respaldan la existencia o autenticidad de algo, estos pueden obtenerse por medio de la observación, medición, ensayo/prueba u otros medios que han cumplido los requisitos para su uso o aplicación específica prevista (Lozada, Lobo, Buegler, Duque, & Martínez, 2012).

Los métodos microbiológicos cualitativos, son usualmente aplicados al control de la calidad de alimentos y aguas, donde la simple presencia del microorganismo en la muestra es significativa e independiente de su recuento. Existen estudios referidos a la aplicación de estos métodos en pruebas de esterilidad en la industria farmacéutica, donde se afirma que es entendible que se desee encontrar un esquema de validación que se ajuste a todas las aplicaciones, pero que esto es imposible, pues todas las tecnologías tienen sus propias peculiaridades (Castro, 2015)

Las cepas de referencias, son un material orgánico que posee un certificado biológico (por el proveedor). La colección certifica que ha suministrado una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se ha caracterizado por pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares adecuadas. Las cepas de referencia se almacenan entre 0-5 °C hasta su uso y se siembran utilizando el medio de cultivo adecuado, las condiciones de incubación y el procedimiento indicado en las instrucciones para cada tipo de microorganismos (Cuesta, 2013).

Escherichia coli es un bacilo corto y móvil gram negativo, que habita normalmente en el tracto gastrointestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, desempeñando un importante papel dentro de la carga microbiana normal y fisiología del intestino. Generalmente, este microorganismo suele ser inocuo, pero algunas cepas son causantes de gastroenteritis y otras enfermedades. Su patogenicidad es bien conocida y se ha asociado a diarrea, colitis hemorrágica, disentería, infecciones urinarias y meningitis entre otras patologías (Bayona, 2009).

Staphylococcus aureus es un microorganismo que se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente ya que posee características particulares de virulencia y resistencia contra antibióticos, lo cual representa un grave problema de salud, esto es, gracias a que su distribución se extiende a nivel mundial y el impacto en la morbimortalidad es considerable a nivel comunitario e intrahospitalario. *Staphylococcus aureus* es importante no solo porque ocasiona infecciones en diversas partes del organismo humano, sino porque es una de las principales bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos ETA (Zendejas-Manzo, Avalos-Flores, & Soto-Padilla, 2014).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) se producen por la absorción de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Sus síntomas más frecuentes son diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etcétera. La mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, virus y parásitos. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA se encuentran especies de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella*, así como la cepa O157:H7 de la enterobacteria *Escherichia coli*. A largo plazo, algunas de estas enfermedades pueden conducir a otros padecimientos; por ejemplo, es posible que una infección con la cepa O157:H7 de *Escherichia coli* provoque el síndrome hemolítico urémico (SHU) con secuelas de insuficiencia renal crónica (González & Rojas, 2005).

El control de los microorganismos causantes de ETA, tanto de las autoridades sanitarias como de las plantas procesadoras de alimentos, depende en cierta medida del método analítico que se utiliza para su detección. La detección y la investigación de los brotes de ETA, constituye uno de los principales retos para el sistema de salud pública, pues requiere obtener, de manera oportuna y eficaz, información médica (datos personales, síntomas, etc.) y análisis de laboratorio de los restos de alimentos o de las materias primas empleadas en su elaboración e, incluso, de las personas involucradas en la manipulación de los alimentos. La detección y la prevención de ETA dependen del esfuerzo conjunto de las autoridades normativas, sanitarias, industriales y educativas, cuyas investigaciones objetivas y detalladas conlleven a una disminución en los riesgos de contaminación de

los alimentos. Para garantizar a los consumidores un alimento seguro e higiénico, es necesario el control de los microorganismos patógenos en todas las etapas de la producción, lo que implica disponer de métodos de diagnóstico que no sólo sean rápidos y sensibles, sino, altamente específicos. Los métodos clásicos de diagnóstico bacteriológico son laboriosos, requieren tiempo y en algunos casos no permiten identificar todas las cepas aisladas, por lo cual, la información que brindan es limitada y dificulta la toma de decisiones (González & Rojas, 2005).

Esta investigación fue realizada en un laboratorio de microbiología de una empresa alimenticia, con el objetivo de realizar la validación de los actuales protocolos y métodos para la determinación de microorganismos, estos resultados ayudarán para el desarrollo de una propuesta inicial para la acreditación del laboratorio antes mencionado.

METODOLOGÍA

El enfoque de la presente investigación es mixta, ya que inicialmente se detallan aspectos cualitativos, como los protocolos que son utilizados dentro de un laboratorio de microbiología de una empresa alimenticia, para después realizar la activación de las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, para estimar el porcentaje de crecimiento microbiano. Los aspectos cuantitativos son abordados en la comparación de los resultados de reproductibilidad, ya que se realizaron diferentes concentraciones del medio de cultivo BPW y se evaluó la respuesta que estos tuvieron.

El diseño de la investigación es documental, donde se utilizó como instrumento para la recopilación de datos, las fuentes primarias y secundarias como: documentos de sitios web, libros digitales, Google académico, artículos científicos, tesis, y documentos de la empresa relacionados con esta investigación.

La actual investigación tiene un alcance descriptivo ya que se caracterizan y detallan los protocolos necesarios para realizar la activación de las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. También posee un alcance explicativo, ya que se detallan y analizan causas y efectos que generan los diferentes niveles de medios de cultivos.

DESARROLLO

Protocolo para la activación de las cepas

Inicialmente se prepararon los medios de cultivos APC (Agar Plate Count) y DG18 (Dicloran Glicerol DG18), donde se colocaron las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Las cajas petri con el medio APC, fueron las determinadas como las referenciales, mientras que las cajas con el medio DG18 fueron para el control negativo.

Medio de cultivos APC (Agar Plate Count)

Es un medio utilizado para la enumeración de bacterias aeróbicas en aguas, aguas residuales y alimentos. En el APC, la Triptona y el Extracto de Levadura suministran las fuentes de nitrógeno y de vitaminas, que requieren para el crecimiento una vasta variedad de microorganismos, la glucosa actúa como fuente de energía. La transparencia del medio y el buen tamaño de las colonias al crecer facilitan los recuentos bacterianos.

La composición por litro de medio en agua purificada es:

Tabla I. Composición del medio de cultivo APC.

Producto	Cantidad
Hidrolizado pancreático de caseína (Tryptona)	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa	1,0 g
Agar	15,0 g

Medio de cultivos DG18 (Dicloran Glicerol DG18)

Este medio sirvió como control negativo, en otras palabras, el proceso consiste en utilizar este grupo de control para asegurarse de que ninguna variable de confusión haya afectado los resultados o eliminar las posibles fuentes de sesgo. Se utilizó un medio de cultivo, donde no deben reproducirse los microorganismos, ya que de existir esto, el procedimiento o el medio no son los adecuados. Este medio de cultivo es utilizado para reproducir hongos (Levaduras y Mohos).

La composición por litro de medio en agua purificada es:

Tabla II. Composición del medio de cultivo DG18.

Producto	Cantidad
Digerido enzimático de caseína	5,00 g
Glucosa	10,00 g
Fosfato potásico	1,00 g
Sulfato de magnesio	0,50 g
Dicloran (2,6 dicloro-4-nitroanilina)	0,002 g
Cloranfenicol	0,10 g
Agar-agar	15,00 g
pH	5,6

Posteriormente se realizó el protocolo para preparar las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Protocolo de preparación de cepas

Las cepas utilizadas son las KWIK-STIK (de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*), las mismas que brindan resultados equivalentes a los métodos tradicionales utilizados en la preparación, el almacenamiento y el mantenimiento de colecciones de cultivos de inventario de referencia. Las preparaciones de microorganismos son rastreables a la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, ATCC®) u otra colección auténtica de cultivos de referencia.

Los microorganismos de KWIK-STIK™, están previstos para usarse como control y para verificar el desempeño de los ensayos, los reactivos y los medios que se usan en las pruebas microbianas para la detección e identificación de microorganismos aislados cultivados.




Figura 1. Microorganismos de KWIK-STIK™



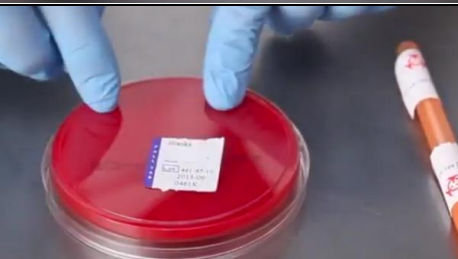



Los gránulos de KWIK-STIK, contienen una población pura de microorganismos y excipientes a los fines de la estructura y/o estabilidad que incluyen gelatina, leche descremada, ácido ascórbico, carbohidrato y carbón. En cada empaque se encuentra un gránulo liofilizado de un microorganismo, una ampolla de líquido hidratante y un hisopo de inoculación. Cada dispositivo está sellado dentro de una bolsa laminada que contiene material desecante para evitar la acumulación perjudicial de humedad. Los microorganismos están a 3 pasos o menos del cultivo de referencia y su recuperación está garantizada cuando se procesan utilizando los requisitos para la incubación y los medios recomendados.





Los microorganismos exigen el uso de tubos estériles y 0,5 ml de líquido estéril, como caldo tripticasa de soya (Tryptic Soy Broth, TSB), caldo de infusión cerebro-corazón (Brain Heart Infusion Broth, BHIB), solución salina o agua desionizada para hidratar la preparación liofilizada. Se necesitan hisopos estériles o asas bacteriológicas para transferir la preparación hidratada a una placa de agar. Adicionalmente estos microorganismos necesitan medios de agar enriquecidos o con nutrientes no selectivos y tiempos y condiciones de incubación específicos para optimizar el cultivo y la recuperación.

El procedimiento específico para la preparación de las cepas de trabajo (referencia) de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* es el siguiente:

Tabla III. Procedimiento para la preparación de las cepas.

Procedimiento	Imagen referencial
Se debe dejar la bolsa con los microorganismos sin abrir, hasta que se “adapte” a la temperatura ambiente.	

<p>Posteriormente se abre la bolsa rasgando a la altura del precorte y se retira la unidad de KWIK-STIK (hisopo). Las partes del hisopo con los microorganismos son las siguientes:</p>	
<p>Se retira la porción de la etiqueta de identificación de “tirar y rasgar”.</p>	
<p>Se coloca la etiqueta a la placa de cultivo principal o al registro de cepas de trabajo. No hay que desarmar el dispositivo mientras se hidrata.</p>	
<p>Sobre el borde de la mesa de trabajo se agrieta la ampolla en la parte superior KWIK-STIK (justo debajo del líquido de la ampolla) para liberar el líquido hidratante.</p>	
<p>Se mantiene vertical y se golpea suavemente sobre una superficie dura cercana para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad que contiene el gránulo del microorganismo.</p>	
<p>Se procede a apretar la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea.</p>	

<p>Inmediatamente se satura el hisopo abundantemente con el material hidratado y se transfiere al medio con agar correspondiente.</p>	
<p>Se inocula la placa de cultivo principal girando con suavidad el hisopo sobre un tercio de la placa. Se esparce nuevamente la muestra con el hisopo por el resto de la placa. Se realiza la misma actividad para 2 placas adicionales del cultivo principal.</p>	
<p>Adicionalmente como controles negativos se procede a realizar el mismo procedimiento anterior, pero sobre un agar que no tenga selectividad con el microorganismo para validar el control negativo.</p>	
<p>Se procede a incubar las placas invertidas de cultivo principal inoculadas a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo.</p>	

Estos medios dos medios de cultivos alojaron a las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, por duplicado, de la siguiente manera:

Tabla IV. Detalle de los dos medios de cultivos preparados.

Caja petri	Detalle
1	Medio APC + <i>Escherichia coli</i>
2	Medio APC + <i>Escherichia coli</i> (duplicado)
3	Medio DG18 + <i>Escherichia coli</i>
4	Medio DG18 + <i>Escherichia coli</i> (duplicado)

5	Medio APC + <i>Staphylococcus aureus</i>
6	Medio APC + <i>Staphylococcus aureus</i> (duplicado)
7	Medio DG18 + <i>Staphylococcus aureus</i>
8	Medio DG18 + <i>Staphylococcus aureus</i> (duplicado)

Estas cajas petri se las deja en reposo durante un día bajo una temperatura de 35 °C.

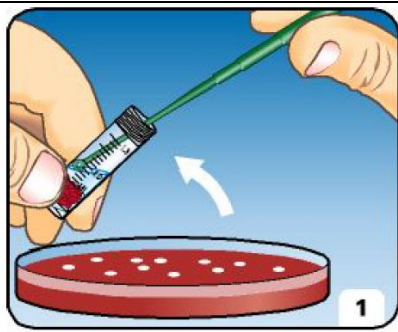

Al siguiente día los microorganismos que han empezado a formarse deben conservarse, en los tubos y perlas del sistema denominado Cryobank, el cual es un sistema de un criovial que contiene perlas químicas tratadas suspendidas en una solución perseverante criogénica especial.

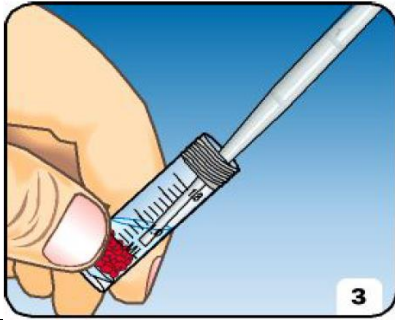
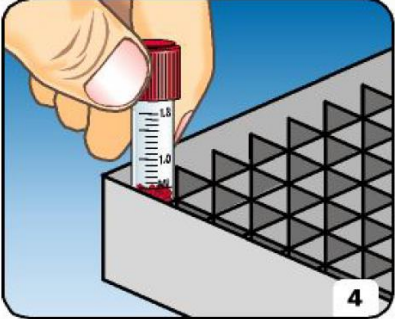
Protocolo para almacenar en forma congelada muestras de cepas (sistema Cryobank)

Después de finalizado el tiempo de incubación del microorganismo en el agar específico, se almacena el cultivo en Cryobank, el cual ayudara a prolongar la vida útil de los mismos bajo condiciones específicas, además permite activar las cepas cuando se requieran de estas.

El procedimiento de almacenamiento de los microorganismos anteriormente indicados es el siguiente (por cada tipo se realizó el mismo protocolo):

Tabla V. Procedimiento para el almacenamiento.

Procedimiento	Imagen referencial
De una placa con cultivo se retira una muestra concentrada y se disuelve en el medio que contiene el Cryobank.	
Se agita fuertemente hasta incorporar completamente la muestra al medio invirtiendo el tubo, esto permitirá que las bacterias se adhieran a las perlas.	

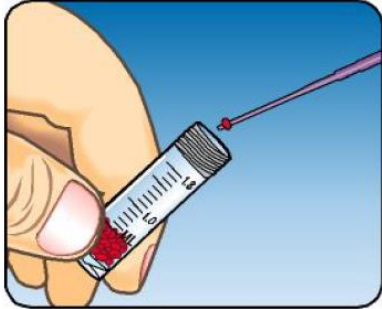
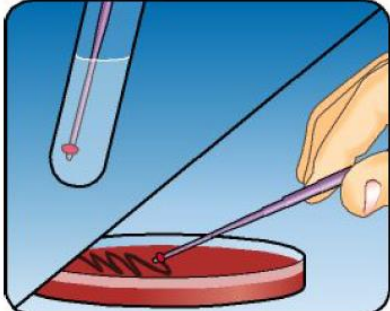
<p>Con una pipeta estéril se remueve del tubo todo el medio de cultivo de Cryobank.</p>	
<p>Una vez que no contenga líquido el tubo se procede a almacenar a temperatura de congelación a 0°C, -20 °C,-50 °C,-70 °C en nitrógeno líquido.</p>	

Este método garantiza que las cepas sean almacenadas por largos períodos de tiempo, para que las mismas sean utilizadas en posteriores análisis.

Proceso de activación de las cepas y de verificación analítica

Las cepas que fueron congeladas se les realizo el siguiente protocolo para activarlas (de la inactivación procedente de la congelación):

Tabla VI. Procedimiento para la activación de las cepas.

Procedimiento	Imagen referencial
<p>Se extrae el tubo de Cryobank del congelador y se remueve la tapa del tubo, posteriormente con una pinza se extrae una perla del recipiente.</p>	
<p>Se procede a pasar la perla sobre la superficie de una placa que contenga un medio de cultivo apropiado. Inmediatamente se descarta la perla utilizada y se regresa el tubo con las perlas sobrantes al congelador para evitar perdida de temperatura.</p>	

Para la activación se utilizaron 5 cajas petri (por cada microorganismo de análisis), en donde se añadió el medio de cultivo APC, y se las incubó durante dos días.

Pasada el tiempo estimado, se inspeccionaron las cajas de petri (10 en total), donde se evidenció que en todas ellas existía crecimiento microbiano.

De la caja petri que poseía un mayor crecimiento microbiano, se le extrajeron los microorganismos con una pequeña espátula, y se los colocó en un tubo de ensayo (uno con *Escherichia coli* y otro con *Staphylococcus aureus*). Este tubo de ensayo contenía una dilución del medio BPW (Buffered Peptone Water), con la siguiente formulación:

Tabla VII. Composición del medio de cultivo BPW.

Producto	Cantidad
Digestión enzimática de caseína	10,00 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Hidrofosfato disódico x 12 H ₂ O (*)	9,00 g
Dihidrógeno fosfato de potasio	1,50 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7

Luego de colocar la mayor concentración del crecimiento de microorganismos en el tubo de ensayo (BPW), se agita y se guardan en rejillas para incubarlas a 35 °C por dos días. Estos serán los “tubos con solución madre”.

Procedimiento para la verificación analítica de un método cuantitativo

La inoculación de la muestra se la realizó usando un inóculo (solución madre) preparado a partir de cepas de referencias que fueron previamente congeladas en el laboratorio.

Se prepararon 5 niveles de involución de la solución madre, tal como lo indica el siguiente diagrama:

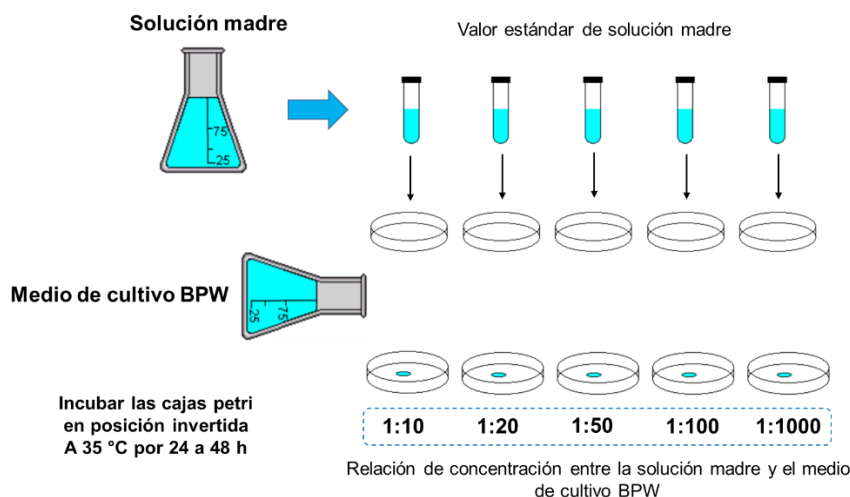


Figura 2. Procedimiento para verificación.

Este procedimiento se lo realizó por duplicado para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Cálculo de los resultados

Inicialmente se determina la desviación estándar de reproducibilidad intermedia (SDiR), con la siguiente formula:

$$SD_{iR} = \sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}}$$

Donde:

n = número de porciones de prueba analizadas por el operador

y_{iA} = resultado obtenido para la i -ésima porción de prueba por el operador A (replica 1)

y_{iB} = resultado obtenido para la i -ésima porción de prueba por el operador B (replica 2)

Para la realización de los diagramas de Bland-Altman, se aplicaron los siguientes cálculos:

$$\bar{y}_i = \frac{ref_i + y_i}{2}$$

$$\Delta y_i = y_i - ref_i$$

$$Bias = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \Delta y_i$$

$$95\% \text{ Tolerance Interval} = Bias \pm t \cdot \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\Delta y_i - Bias)^2}$$

Donde:

y_i = resultado obtenido para la i -ésima porción de prueba

ref_i = valor de referencia

n = número de muestras analizadas por el operador

t = percentil de la distribución “t Student” para la probabilidad elegida del intervalo (aquí 95%) y grados de libertad

Resultados de reproducibilidad

Los datos del número de colonias de *Escherichia coli*, fueron los siguientes:

Tabla VIII. Resultados de reproductibilidad de *Escherichia coli*.

Datos obtenidos en el estudio						
Réplica	Referencia (sin alimento)	1:10	1:20	1:50	1:100	1:1000
	CFU/g or mL	CFU/g or mL	CFU/g or mL	CFU/g or mL	CFU/g or mL	CFU/g or mL
1	120	68	54	130	160	120
2	149	40	62	128	139	150
3	139	66	88	90	120	160
4	187	57	105	110	145	110
5	170	59	75	121	162	140
6	115	65	86	91	129	110

Donde se realizaron 6 réplicas o repeticiones (1, 2, 3, 4, 5, 6), en 5 diferentes concentraciones del medio de cultivo BPW (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:1000). Cabe mencionar que existió un patrón de referencia de la cepa corrida a una sola dilución primaria.

La guía GU-31.945 menciona que en los métodos cuantitativos, el límite de aceptación debe ser del 95 % para esto es necesario 6 tipos de diluciones (incluyendo el patrón de referencia) y 6 valores por cada dilución (réplicas), para obtener un valor más confiable y amplio.

Con la ayuda de la macro de Excel, se transforman los resultados obtenidos en logaritmo de base 10, de la siguiente manera:

Tabla IX. Resultados 2 de reproductibilidad de *Escherichia coli*.

Nivel de inoculación (log ₁₀ CFU/g or mL)	2,190					
Réplica	Referencia (sin alimento)	1:10	1:20	1:50	1:100	1:1000

	log CFU/g or mL	log CFU/g or mL	log CFU/g or mL	log CFU/g or mL	log CFU/g or mL	log CFU/g or mL
1	2,079	1,833	1,732	2,114	2,204	2,079
2	2,173	1,602	1,792	2,107	2,143	2,176
3	2,143	1,820	1,944	1,954	2,079	2,204
4	2,272	1,756	2,021	2,041	2,161	2,041
5	2,230	1,771	1,875	2,083	2,210	2,146
6	2,061	1,813	1,934	1,959	2,111	2,041
N	6	6	6	6	6	6
Media	2,160	1,766	1,883	2,043	2,151	2,115
Desviación estándar	0,083	0,085	0,106	0,072	0,051	0,070
Parcialidad	-0,031	-0,394	-0,276	-0,117	-0,008	-0,045
Baja 95% TI	N/A	-0,631	-0,571	-0,316	-0,151	-0,240
Baja 95% TI	N/A	-0,157	0,019	0,082	0,134	0,150
Límite de aceptabilidad inferior	N/A	-0,500	-0,500	-0,500	-0,500	-0,500
Límite de aceptabilidad superior	N/A	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
95% dentro del límite de aceptabilidad	N/A	NO OK	NO OK	OK	OK	OK

Estos valores generan la siguiente figura:

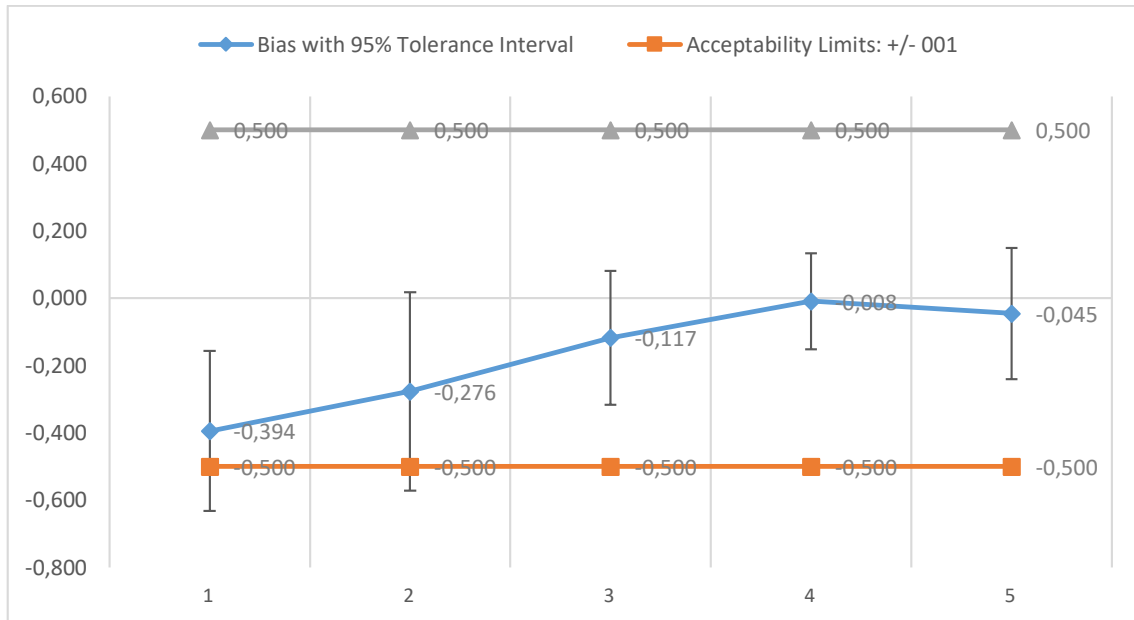


Figura 3. Límites de aceptabilidad de *Escherichia coli*.

La figura 3 confirma de manera visual lo indicado en la tabla anterior, que las concentraciones que se encuentran debajo de la línea anaranjada (1:10 y 1:20), no cumplen el límite de aceptabilidad basados en su repetibilidad, esto ayuda a determinar cuáles son las diluciones efectivas para trabajar y validar un método (esto va a depender del tipo de microorganismo y el análisis a realizar). Por otro lado, las diluciones a 1:50, 1:100 y 1:1000, se encuentran dentro de los rangos establecidos, es decir son valores aceptables. En este caso, escogeríamos cualquiera de las diluciones ya sea 1:100 o 1:1000 para validar el método ya que son las más precisas.

Los datos del número de colonias de *Staphylococcus aureus*, fueron los siguientes:

Tabla X. Resultados de reproductibilidad de *Staphylococcus aureus*.

Datos obtenidos en el estudio						
Réplica	Referencia (sin alimento)	1:10	1:20	1:50	1:100	1:1000
	CFU/g or mL	CFU/g or mL	CFU/g or mL	CFU/g or mL	CFU/g or mL	CFU/g or mL
1	1500	1000	1280	1200	1400	1000
2	1600	900	1300	1150	1450	1000
3	1570	920	1420	1400	1610	1000
4	1600	1100	1300	1600	1570	1000
5	1700	980	1020	1400	1600	1000

6	1650	1360	1100	1200	1700	2000
---	------	------	------	------	------	------

Los resultados de la tabla anterior, transformados en logaritmos de base 10 son:

Tabla XI. Resultados 2 de reproductibilidad de *Staphylococcus aureus*.

Nivel de inoculación (log ₁₀ CFU/g or mL)	3,207					
Replica	Referencia (no alimento)	1:10	1:20	1:50	1:100	1:1000
	log CFU/g or mL	log CFU/g or mL	log CFU/g or mL	log CFU/g or mL	log CFU/g or mL	log CFU/g or mL
1	3,176	3,000	3,107	3,079	3,146	3,000
2	3,204	2,954	3,114	3,061	3,161	3,000
3	3,196	2,964	3,152	3,146	3,207	3,000
4	3,204	3,041	3,114	3,204	3,196	3,000
5	3,230	2,991	3,009	3,146	3,204	3,000
6	3,217	3,134	3,041	3,079	3,230	3,301
N	6	6	6	6	6	6
Media	3,205	3,014	3,090	3,119	3,191	3,050
SD	0,019	0,066	0,053	0,055	0,031	0,123
Parcialidad	-0,002	-0,191	-0,115	-0,085	-0,014	-0,155
Baja 95% TI	N/A	-0,374	-0,264	-0,239	-0,101	-0,496
Baja 95% TI	N/A	-0,007	0,033	0,068	0,073	0,187
Límite de aceptabilidad inferior	N/A	-0,500	-0,500	-0,500	-0,500	-0,500
Límite de aceptabilidad superior	N/A	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
95% dentro del límite de aceptabilidad	N/A	OK	OK	OK	OK	OK

En base a los cálculos anteriores se obtiene la siguiente figura:

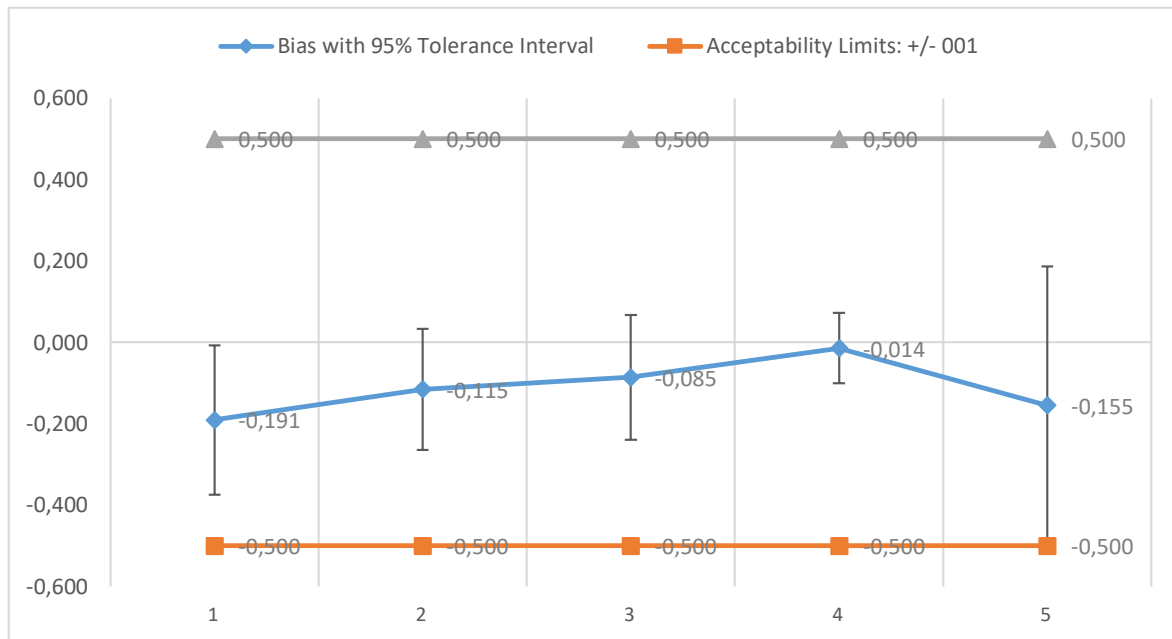


Figura 4. Límites de aceptabilidad de *Staphylococcus aureus*.

Según la data estadística, estos valores cumplen el límite de aceptabilidad basados en su repetibilidad lo cual se puede evidenciar en la figura. Los valores (OK) están dentro del valor de aceptabilidad, en este caso se puede escoger cualquiera de las diluciones (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:1000), para validar un método ya que todas son precisas.

CONCLUSIONES

Se concluye, que mediante la identificación de los protocolos y la capacitación del personal con el plan de formación 10-20-70, se pudo realizar la activación de cepa, en la cual las cajas petri con el medio APC, fueron las definitivas como de referencia, mientras que las cajas con el medio DG18 fueron para el control negativo. Mediante la correcta preparación y almacenamiento se alcanzó activar las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, donde se consiguió la estimación del crecimiento microbiano de las colonias.

Se logró la comparación de los resultados de reproducibilidad, mediante la realización de 6 réplicas o repeticiones (1, 2, 3, 4, 5, 6), en 5 distintas concentraciones del medio de cultivo BPW (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:1000). Donde la guía GU-31.945 nos señaló que, en los métodos cuantitativos, el límite de aprobación debe ser del 95 %. Los datos del número de colonias de *Escherichia coli*, nos indicaron que las concentraciones (1:10 y 1:20), no cumplen el límite de aceptabilidad, esto nos ayudó a definir las soluciones seguras para trabajar y validar el método. En cambio, las diluciones a 1:50, 1:100 y 1:1000, estaban dentro de los rangos establecidos, es decir son valores aceptables para la validación del método. Por otro lado, los datos obtenidos de *Staphylococcus aureus*, nos indicaron que todos los valores cumplen el límite de aceptabilidad, basados en su repetibilidad, en este caso se pudo escoger cualquiera de las soluciones (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:1000), para la validación del método.

REFERENCIAS

- Bayona, M. (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*, 12(2), 9-17.
- Castro, C. (2015). Verificación de Métodos Microbiológicos Cualitativo y Cuantitativo. Nestlé Quality Assurance Center.
- Cuesta, A. (2013). *Aseguramiento de calidad*. Guayaquil: FAO. Obtenido de Cultivos de referencias:
http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/comagric/codex/rla3013/pdf/aseg4.pdf
- González, T., & Rojas, R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*, 47(5), 388-390. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v47n5/28385.pdf>
- Herrera, M., García, C., & Méndez, G. (2008). Desarrollo y validación de un método analítico aplicable al control de la calidad del picosulfato de sodio gotas orales. *Revista Cubana de Farmacia*, 42(2). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152008000200003
- Lozada, Y., Lobo, E., Buegler, Y., Duque, A., & Martínez, S. (2012). Validación del método de cultivo microbiológico. *Redvet*, 13(11), 2-15. Obtenido de redalyc.org/pdf/636/63624842015.pdf
- Orberá, R. (2004). Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. *Revista Cubana de Salud Pública*, 30(3).
- Zendejas-Manzo, G., Avalos-Flores, H., & Soto-Padilla, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Biomed*, 25, 129-143. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>