

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS Y AGUAS DE CONSUMO
HUMANO EN EL LABORATORIO QC S.A.S**

MARIA ANGELICA VERGARA PABUENA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar por el título de Microbióloga

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
PROGRAMA MICROBIOLOGIA
PAMPLONA NORTE DE SANTANDER
2016**

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS Y AGUAS DE CONSUMO
HUMANO EN EL LABORATORIO QC S.A.S**

MARIA ANGELICA VERGARA PABUENA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar por el título de Microbióloga

**Asesor Académico:
PhD. JOSÉ FÉLIX ORTIZ LEMUS**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
PROGRAMA MICROBIOLOGIA
PAMPLONA NORTE DE SANTANDER
2016**

Nota de aceptación:

Jurado 1

Jurado 2

DEDICATORIA

A Dios por darme la sabiduría para enfrentar cada uno de los obstáculos del camino. A mis padres Dairo de Jesús Vergara y Ada Luz Pabuena por amarme y no permitir que me derrumbara en el camino, por su lucha incesante para que no me faltara nada e impulsarme a luchar día a día por lo que deseaba. A mi primo Jesús Evangelista Gómez Vergara por su compañía moral a lo largo de mi carrera y sus sabios consejos. A mis hermanos Dairo y Maira por apoyarme siempre. A mi profe Enrique Alfonso Cabeza Herrera por confiar en mí y acompañarme en esta difícil pero maravillosa travesía, y a lo más importante en mi vida, mis motores Ángel David, Mariangel y David, mis sobrinos

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme explorar un mundo extraño y desconocido, pero maravilloso como lo es la microbiología

Gracias a mi familia por creer que este sueño si era posible.

A cada uno de mis profes que me acompañaron, apoyaron y creyeron en mí, en especial a mi profe José Félix Ortiz Lemus por guiarme y asesorarme a lo largo de mi trabajo de grado

Gracias a la Dra María Cristina Gómez Cadavid por brindarme la oportunidad de realizar mis prácticas profesionales en el Laboratorio QCS.A.S, gracias por sus sabios consejos

Gracias a la familia QC. A Digna Luz Usuga por confiar en mí y abrirme las puertas de su casa y su familia. A Leidy, Claudia, Elkin y Mary por sacarme una sonrisa aun en mis días más amargos, a Jorge por dejar de lado la parte química y convertirse en microbiólogo por instantes y apoyarme en este trabajo, a Darwin por su paciencia, colaboración y aportes, A Rossi por apoyarme siempre y creer en mi. Gracias a todos porque sin ustedes esto no sería posible, gracias por su buena vibra, estoy infinitamente agradecida con Dios por permitirme compartir con cada uno de ustedes.

Gracias amiguixx Laura y Marce por ser más que mis amigas, por apoyarme y reírse de cada una de mis locuras y aceptarme tal cual soy, sin reproches, con todos mis defectos.

Infinitas Gracias a mi queridísimo profesor de Bioquímica Daniel Iván Barrera Valderrama por enseñarme A CREER EN MI y a decir YO PUEDO Y SOY CAPAZ DE LUCHAR POR MIS SUEÑOS Y TODO LO QUE ME PROPONGA

Estoy inmensamente agradecida con todos porque para bien o para mal me han hecho crecer como persona y como profesional, no cambiaría ningún momento de mi vida por el cual pase para llegar hasta esta etapa de mi vida.

Tabla de Contenido

INTRODUCCION.....	13
1. OBJETIVOS.....	14
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. MARCO REFERENCIAL.....	16
3.1 BASES LEGALES:.....	16
3.1.1 Norma Técnica NTC-ISO/IEC Colombiana 17025.....	16
3.1.2 <i>Standard Methods</i>	16
3.1.3 Decreto 1575 del 2007.....	16
3.1.4 Resolución 2115 del 2007.....	16
3.1.5 Guía Técnica Colombiana GTC 84.....	16
3.2 ANTECEDENTES.....	17
3.3 SISTEMA TEÓRICO.....	17
3.3.1 El agua.....	17
3.3.2 Microorganismos indicadores de la calidad del agua.....	18
3.3.3 Filtración por Membrana.....	19
3.4 Validación.....	20
3.4.1 Validación primaria.....	21
3.4.2 Validación secundaria.....	21
3.5 Generalidades de la validación.....	22
3.6 Tipos de validación.....	22
3.6.1 Validación prospectiva.....	22
3.6.2 Validación concurrente.....	22
3.6.3 Validación retrospectiva.....	22
3.7 Parámetros analíticos del proceso de validación.....	23
3.7.1. Límite de detección.....	23
3.7.2 Límite de cuantificación.....	23

3.7.3 Exactitud.....	23
3.7.4 Especificidad	23
3.7.5 Precisión.....	24
3.7.6 Selectividad	24
3.7.7 Robustez.	24
3.7.8 Repetibilidad.....	24
3.7.9 Reproducibilidad.....	24
4. METODOLOGÍA	25
4.1 MATERIALES.....	25
4.1.1 Reactivos.....	25
4.1.2 Material de vidrio	25
4.1.3 Materiales estériles.....	25
4.1.4 Cepas	25
4.1.5 Equipos	25
4.2 Métodos.....	26
4.2.1 Equipos e instrumental de laboratorio	26
4.2.2 Control de ambiente	26
4.2.3 Control de superficies.....	26
4.2.4 Preparación del patrón de Mcfarland.....	26
4.2.5 Cepas de referencia	26
4.2.6 Control de calidad de los medios de cultivo	27
4.2.7 Control de esterilización de las autoclaves.....	27
4.2.8 Control de crecimiento de microorganismos.	27
4.2.8.1 Test Ecométrico.....	27
4.2.9 Control negativo - muestra	29
4.2.10 Estandarización del inóculo.....	29
4.2.11 Filtración por Membrana.....	29
4.2.12 Prueba de repetibilidad. (Páez, 2008)	30

4.2.13 Prueba de reproducibilidad (Páez, 2008).	30
4.2.14 Prueba de robustez (Ospino, 2013).....	30
6.2.16 Análisis estadísticos	31
5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	34
6. RESULTADOS y ANALISIS DE RESULTADOS.....	36
6.1 Control de ambientes y superficies.....	36
6.2 Escala de Mcfarland.	37
6.3 Control de calidad de los medios de cultivo.....	39
6.4 Prueba de esterilidad de los medios de cultivos.	43
6.5 Control de esterilización de las autoclaves.....	43
6.5 Control negativo – (Blancos).....	44
6.7 Estandarización del inóculo y de la técnica de filtración por membrana.	44
6.8 Repetitividad y Reproducibilidad	47
6.8.2 Robustez	55
6.9 ACTIVIDADES RUTINARIAS EN EL LABORATORIO QC S.A.S	55
7. CONCLUSIONES.....	59
8. RECOMENDACIONES O SUGERENCIAS	60
9. GLOSARIO	61
10. BIBLIOGRAFÍA.....	62

Lista de tablas

Tabla 1. Ventajas y desventajas del método de filtración por membrana.	20
Tabla 2. Interpretación del Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) para microorganismo interferente	28
Tabla 3. Interpretación del Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) para microorganismos referentes o de interés	29
Tabla 4. Parámetros microbiológicos realizados a distintos alimentos con su respectiva norma.	32
Tabla 5. Análisis microbiológicos ofrecidos en el Laboratorio QC S.A.S a los clientes para análisis de alimentos	33
Tabla 6. Recuento microbiológico para mesófilos, mohos y levaduras en el área de microbiología en el laboratorio QC S.A.S	36
Tabla 7. Absorbancias teóricas comparadas con absorbancias prácticas del Patrón McFarland	38
Tabla 8. Características morfológicas de las cepas de trabajo.	40
Tabla 9. Formato de validación microbiología para verificación de reporte de datos de acuerdo a la NTC 4092	46
Tabla 10. Formato de análisis para el método de filtración por membrana para repetibilidad y reproducibilidad por diferentes analistas.....	48
Tabla 11. Validación del método de filtración por membrana utilizando una fuente natural de agua para consumo humano (potable)	50
Tabla 12. Validación del método de filtración por membrana utilizando una fuente natural de agua para consumo (envasada)	51
Tabla 13. Balance mensual de la cantidad de parámetros microbiológicos ofrecidos en el Laboratorio QC S.A.S a los clientes para análisis de alimentos y aguas	56

Lista de Ilustraciones

Ilustración 1. Método ecométrico empleado para pruebas de eficacia del medio de cultivo.....	28
Ilustración 2. Preparación del inóculo para realización de prueba de repetibilidad	30
Ilustración 3. Escala química Patrón McFarland.....	37
Ilustración 4. Crecimiento <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Derecha) y <i>Escherichia coli</i> (Izquierda). A. Agar Colinstant B. Agar Chromocult.....	39
Ilustración 5. Test Ecométrico <i>Staphylococcus sp.</i> A. Agar Baird Parker, B. Agar Plate Count, C. Agar colinstant.....	41
Ilustración 6. Test Ecométrico Agar Colinstant. A. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , B. <i>Escherichia coli</i> , C. <i>Klebsiella pneumoniae</i> D. <i>Staphylococcus spp.</i>	42
Ilustración 7. Test Ecométrico: A. Agar Plate Count, B. Agar Cetrimide, C. Agar Colinstant empleando la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
Ilustración 8 . Filtración por membrana de muestras sin inocular (Blancos), ausencia de crecimiento.	44
Ilustración 9. Resultado de la filtración por triplicado de diluciones seriadas del patrón Mcfarland 0,5.	45

Lista de Graficas

Grafica 1 Estandarización del patrón McFarland Vs absorbancias teóricas y prácticas.	38
Grafica 2. Recuentos obtenidos por el método de filtración por membrana	46
Grafica 3. Gráfico de control de precisión.	52
Grafica 4. Gráfico de control de precisión.	53
Grafica 5. Diferentes alimentos analizados en el laboratorio QC S.A.S.....	57
Grafica 6. Diferentes tipos de aguas analizadas en el laboratorio QC S.A.S.....	57

Lista de Anexos

Anexos 1. Certificado ATCC <i>Escherichia coli</i>	66
Anexos 2. Certificado ATCC <i>Klebsiella pneumoniae</i>	67
Anexos 3. Certificado de calidad de <i>Pseudomonas aeruginosas</i>	68
Anexos 4. Certificado de calidad de bioindicador, para esterilización de autoclaves.....	69
Anexos 5. Estandarización inóculos de trabajo para filtración por membrana.	70
Anexos 6. Reactivación de cepas de referencia.	71
Anexos 7. Filtración por membrana de aguas para consumo humano, A. pool, B. <i>K. pneumoniae</i> 4352 y C. <i>E. coli</i> 25922 en agar colinstant.....	72
Anexos 8. Resultados obtenidos a partir de la filtración por membrana de las diluciones seriadas de <i>E. coli</i> ATCC 25922 y <i>K. pneumoniae</i> 4352	73
Anexos 9. Carta de control de precisión microbiológica, para determinación de la precisión del método de filtración por membrana para el análisis de agua potable a partir de recuentos microbiológicos incubados a 24 y 48 horas.....	74
Anexos 10. Estandarización técnica filtración por membrana. (Standard Methods numeral 9222) (Rice et al., 2012).....	75
Anexos 11. Seguimiento al control de esterilización de Autoclaves.....	77

INTRODUCCION

Actualmente el interés de los laboratorios de las diferentes áreas de la microbiología es mantener controladas todas las variables que intervienen en la veracidad y confiabilidad de sus resultados, por lo que la validación es implementada como una herramienta útil para asegurar la trazabilidad de cada una de las variables, viéndose reflejado en los resultados de las pruebas realizadas. Adicionalmente, el desempeño de los requisitos reglamentarios relacionados con el funcionamiento de los laboratorios de ensayo establecidos en la NTC ISO/IEC 17025 del 2005 implica dentro de sus lineamientos la implementación de un sistema de gestión de calidad basado en la documentación, la cual juega un papel muy importante en el desarrollo de todos los procesos que se llevan a cabo (García, 2006).

El Laboratorio QC S.A.S ubicado en Apartadó (Antioquia) comenzó a prestar servicios de análisis de tipo fisicoquímico de aguas y microbiológico de aguas y alimentos, mediante la aplicación de métodos estandarizados; con equipos adecuados y personal capacitado y comprometido con las buenas prácticas profesionales, que permiten dar un servicio oportuno, seguro y eficaz que satisfaga los requisitos del cliente, bajo la norma NTC ISO/IEC 17025/2005 “Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayo y calibración”

Actualmente el laboratorio QC S.A.S realiza análisis microbiológico de alimentos listos para consumo humano y aguas, bajo los lineamientos estipulados por el INVIMA y Standard methods, respectivamente. De tal forma y en pro de mejorar los servicios que se prestan en el análisis microbiológicos de aguas, se estimó que era necesario validar la determinación de coliformes totales y *Escherichia coli* empleando la técnica de filtración por membrana utilizando agar cromogénico (Colinstant), con el fin de lograr la acreditación de nuevos parámetros de aguas ante el IDEAM bajo la norma ISO 17025-2005.

De esta forma, una vez valorada la precisión, especificidad, y robustez del método se logró obtener resultados repetibles y reproducibles al interior del laboratorio de QC S.A.S, permitiendo validar la técnica de filtración por membrana empleando el medio Colinstant.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Cumplir con las actividades enmarcadas en los servicios microbiológicos que ofrece el Laboratorio QC S.A.S.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar coliformes totales y *E. coli* mediante filtración en membrana.
- Validar el método de filtración por membrana en aguas para consumo humano para la determinación de coliformes totales y *Escherichia coli* en el LABORATORIO QC S.A.S.
- Determinar la recuperabilidad, repetibilidad y reproducibilidad del método de filtración por membrana en la detección de coliformes totales y *Escherichia coli*
- Emplear los lineamientos estipulados por el INVIMA para el análisis microbiológico de alimentos preparados listos para consumo.

2. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento sobre la calidad del agua de consumo es importante debido a los riesgos que ocasiona en la salud pública el contagio de enfermedades transmitidas a través del recurso hídrico por agentes bacterianos, virales o parasitarios presentes en ella. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que 2,9 millones de personas mueren cada año en el mundo por enfermedades causadas por falta de acceso a agua potable y saneamiento básico (Guzmán, et al., 2014).

El Laboratorio QC S.A.S es una empresa privada ubicada en el Urabá antioqueño acreditada por el IDEAM para la prestación de servicios de muestreos y análisis fisicoquímicos. Su objetivo primordial es prestar un servicio oportuno y de la mejor calidad, apoyados en un grupo interdisciplinario de profesionales altamente calificados y comprometidos en llevar a cabo los objetivos de la organización usando normas estandarizadas, que fomentan el aseguramiento de la calidad y el desarrollo ambiental sostenible.

En este momento el laboratorio se encuentra en un proceso de acreditación de nuevos parámetros de aguas ante el IDEAM bajo la norma ISO 17025-2005. Uno de estos nuevos parámetros próximos a acreditar, es el análisis microbiológicos de coliformes totales y *E. coli* a través de la técnica de filtración por membrana.

La validación de los parámetros antes mencionados permitirá que el LABORATORIO QC S.A.S, pueda demostrar que brinda resultados, oportunos, confiables y reproducibles a sus clientes.

La creciente necesidad de generar resultados oportunos y confiables, aumenta el interés de validar el método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de aguas para consumo humano. Ya que, la presencia de estos microorganismos (coliformes totales y fecales) es indicador potencial de la calidad microbiológica del agua y por ende nos permite identificar si son aptas o no, para consumo humano.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 BASES LEGALES:

3.1.1 Norma Técnica NTC-ISO/IEC Colombiana 17025

Esta Norma Internacional establece los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos y/o de calibraciones, incluidos métodos normalizados, no normalizados y desarrollados por el mismo laboratorio. Siendo aplicable a todos los laboratorios, independientemente de la cantidad de empleados. Por lo que Cuando un laboratorio no realiza una o varias de las actividades contempladas en esta Norma Internacional, los requisitos de los apartados correspondientes no se aplican (ISO/IEC 17025, 2005).

La importancia de la de la implementación de la norma radica en la contribución que genera a la mejora de los sistemas de gestión de la calidad, administrativa y técnica. También puede ser utilizada por los clientes del laboratorio, las autoridades reglamentarias y los organismos de acreditación cuando confirman o reconocen la competencia de los laboratorios. (ISO/IEC 17025, 2005).

3.1.2 *Standard Methods*

Métodos estándar para el Análisis de Aguas y Aguas Residuales

Empleado para el examen de aguas (tratadas, envasadas, potables, crudas, residuales, entre otras) ha representado "la mejor práctica actual de los analistas de agua en América." En esta extensa guía se cubren todos los aspectos de las técnicas de análisis para aguas y aguas residuales. *Standard Methods* es una publicación conjunta de la Asociación Americana de Salud Pública (*APHA*), Asociación Americana de Obras Sanitarias (*AWWA*), y Federación Ambiental de Aguas (*WEF*).

3.1.3 Decreto 1575 del 2007

Se establecen las condiciones, recursos y obligaciones mínimas que deben cumplir las autoridades sanitarias departamental, distrital y municipal para elaborar mapas de riesgos de calidad del agua para consumo humano, con el fin controlar los riesgos para la salud humana causados por su consumo, exceptuando el agua envasada

3.1.4 Resolución 2115 del 2007

Se señalan las características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo. Dicho decreto y resoluciones están con el fin de asegurar un producto que no ponga en riesgo la salud del consumidor.

3.1.5 Guía Técnica Colombiana GTC 84

Trata acerca de la validación de métodos microbiológicos, con especial énfasis en métodos cuantitativos selectivos en los cuales el recuento de partículas, es

realizado directamente, con la ayuda de un microscopio, o indirectamente, sobre la base del crecimiento (multiplicación) en colonias o turbidez.

3.2 ANTECEDENTES

En el país se ha trabajado mucho en la validación del método de filtración por membrana para determinación de coliformes totales y *E. coli*, sujetas a la ISO-IEC 17025 requerida para la obtención de la autorización, certificación y acreditación de los laboratorios de ensayo. Los cuales sirvieron de guía para la elaboración de este trabajo.

- Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar chromocult, en donde se logró concluir que el método es reproducible, repetible y se obtuvo un porcentaje de recuperación superior al 96% para *E. coli*, comparado con los otros microorganismos (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028; *Enterobacter aerogenes* ATCC: 13048) (Carrillo y Zapata, 2008)
- Validación secundaria del método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de aguas para consumo humano analizadas en el laboratorio de salud pública del Huila y al finalizar el estudio de validación se comprobó que mediante este proceso se cumplieron con los dos parámetros evaluados, la precisión y la exactitud (Páez, 2008)
- Filtración por membrana para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas, llevó a cabo la validación de la técnica de filtración utilizando el agar cromogénico (Colinsant) para demostrar que es un método alternativo que reduciría costos y tiempo en los resultados (Ospino 2013)

Existe mucha más información teórica en el país a cerca de validación del método de filtración por membrana, elaborados como trabajos de grado por estudiantes de diferentes universidades, principalmente de la Pontificia Universidad Javeriana en diferentes años, la Corporación Universitaria Rafael Núñez también ha realizado validaciones de la técnica.

3.3 SISTEMA TEÓRICO.

3.3.1 El agua

El agua juega un papel primordial en el desarrollo de los seres vivientes sobre la Tierra, pudiéndose decir que es la base de la vida.

En efecto, la mayor parte del organismo humano está formada por agua y constituye el primero de sus alimentos después del aire.

Es de primordial interés controlar la calidad del agua, ya que es posible que ligeras variaciones en el contenido de alguna de las sustancias presentes puede variar

sensiblemente su calidad y hasta la puede convertir en inservible y a veces hasta peligrosa para la salud (Carrillo y Lozano, 2008).

El control de la calidad microbiológica y química del agua de consumo requiere el desarrollo de planes de gestión cuya aplicación constituya la base para la protección del sistema y el control de los procesos con el fin de garantizar que las concentraciones de agentes patógenos y sustancias químicas existentes ocasionen riesgos para la salud pública insignificantes y que el agua sea aceptable para los consumidores (Ocasio y Lopez, 2004).

La presencia de bacterias patógenas en el agua destinada a consumo humano es un riesgo siempre presente, ya que un agua contaminada puede ser la causa de una serie de enfermedades. Por ello existe la necesidad de realizar análisis rutinarios a partir de muestras de agua de distintas procedencias: fuentes, ríos, conducciones municipales, aguas de baño, manantiales, aguas embotelladas, etc (Ocasio y Lopez, 2004).

La gran variedad de bacterias patógenas que pueden encontrarse en una muestra de agua y la complejidad de su aislamiento e identificación, hace inviable el control rutinario de todos los microorganismos con importancia sanitaria.

Los microorganismos indicadores que cumplen estos requisitos son los coliformes totales y fecales; En la normativa se indica que debe haber ausencia de coliformes fecales y totales (Resolución 2115, 2007).

3.3.2 Microorganismos indicadores de la calidad del agua

Varios organismos patógenos de transmisión fecal-oral pueden estar presentes en el agua cruda (agua natural que no ha sido sometida a proceso de tratamiento para su potabilización), entre ellos bacterias como *Salmonella* sp, *Shigella* sp, coliformes totales y fecales, los cuales han sido encontradas en abastecimientos de aguas (Ocasio y López, 2004).

Los coliformes totales son las Enterobacterias lactosa-positivas y constituyen un grupo de bacterias que se definen más por las pruebas usadas para su aislamiento que por criterios taxonómicos. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, más o menos rápidamente, en un periodo de 48 horas y con una temperatura de incubación comprendida entre 30-37°C (Shekhar N.C et al. 2007).

Son bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. Del grupo <<coliforme>> forman parte varios géneros: *Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., etc. Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también en otros ambientes: agua, suelo, plantas, cáscara de huevo, etc (Shekhar N.C et al. 2007).

Una elevada proporción de los coliformes que existen en los sistemas de distribución no se debe a un fallo en el tratamiento en la planta, sino a un recrecimiento de las bacterias en las conducciones. Dado que es difícil distinguir

entre recrecimiento de coliformes y nuevas contaminaciones, se admite que todas las apariciones de coliformes son nuevas contaminaciones, mientras no se demuestre lo contrario (Shekhar N.C et al. 2007).

Dentro del grupo de los coliformes totales existe un subgrupo que es el de los Coliformes fecales. Los coliformes fecales son coliformes totales que además fermentan la lactosa con producción de ácido y gas en 24-48 horas a temperaturas comprendidas entre 44 y 45°C en presencia de sales biliares. Los coliformes fecales comprenden principalmente *Escherichia coli* y algunas cepas de *Enterobacter* y *Klebsiella* (HAYES; 1993).

Su origen es principalmente fecal y por esos se consideran índices de contaminación fecal. Pero el verdadero índice de contaminación fecal es *Escherichia coli* tipo I ya que su origen fecal es seguro. Desde el punto de vista metodológico *Escherichia coli* es el Coliforme positivo a la prueba del Indol (Gamazo.C, et al. 2005).

3.3.3 Filtración por Membrana

El número de coliformes totales presentes en el agua se determina mediante la filtración de volúmenes específicos de la muestra a través de filtros de membrana. Por lo general, están compuestos de ésteres de celulosa, típicamente con poros de 0,45 µm de diámetro que retienen los coliformes totales y otras clases de bacterias presentes en la muestra. Después se incuban las membranas vueltas hacia arriba en un medio selectivo. En la práctica, la técnica de filtración de membrana ofrece resultados comparables a los que se obtienen con el método de tubos múltiples (Sharlab, 2016).

Una de las ventajas del método de filtración a través de membrana es la prontitud con que pueden obtenerse los resultados y, en consecuencia, se pueden llevar a cabo rápidamente acciones correctivas y operar en la planta de agua de nuevo en forma normal. Esta técnica puede aplicarse en el análisis de casi todos los tipos de agua, también se utiliza en el análisis de leche y otros alimentos líquidos. (Sharlab, 2016) La técnica de filtración por membrana, proporciona resultados confiables, altamente reproducibles, además permite analizar o estudiar volúmenes relativamente grandes de muestra (APHA 1992).

Este método permite de manera rápida y sencilla obtener un estimado de una población de coliformes totales y fecales en un cuerpo de agua, además la gran utilidad de analizar gran número de muestras o realizar diariamente muchas pruebas para este grupo de microorganismos (HACH 2000).

Tabla 1. Ventajas y desventajas del método de filtración por membrana.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Método relativamente sencillo Obtención de resultados en un corto periodo de (24 horas) en comparación con método de número más probable Si se cuenta con los equipos necesarios dicho método (FM) puede ser utilizado en pruebas de campo	No es recomendable momento de analizar muestras muy turbias o con alta carga microbiana Esta dificultad se logra superar, realizando diluciones de la muestra o haciendo inóculos más pequeños de acuerdo con el tipo de matriz que se quiere analizar

(Ospino, 2013).

3.4 Validación

La validez en los resultados de los análisis microbiológicos se ven afectados por factores como: La preparación del inóculo, la naturaleza de los microorganismos utilizados, las condiciones específicas de la prueba, las condiciones de recuperación, entre otros. Los métodos y especialmente los relacionados con el análisis microbiológico del agua potable, dada la importancia como materia prima, ingrediente y disolvente en el procesamiento, formulación, fabricación de productos farmacéuticos y para el consumo humano, deben ser validados (Carrillo y Lozano, 2008).

“la validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”. Para ello, es necesario conocer las características de funcionamiento del método tan extensamente como sea necesario (ENAC, 2011).

Validar se refiere al conjunto de acciones que demuestran formalmente que un sistema realiza lo que se supone debe hacer, de forma continuada y ajustada al objetivo de análisis. Al validar un método se demuestra formalmente que el mismo posee un determinado nivel de parámetros analíticos básicos: exactitud, precisión, sensibilidad, intervalo lineal, selectividad y robustez (Useche, 2003).

Según la ISO/TR 13843:2000 la validación para métodos microbiológicos se hace casi siempre en varias etapas. Las investigaciones sobre el funcionamiento real del método deberían ir precedidas de un estudio del rango de trabajo fiable en el cual es pertinente el funcionamiento del método. Cualquier comparación entre las tasas de recuperación de dos métodos debería estar limitada a los casos para los cuales ambos métodos sean fiables (Ordoñez y Rojas, 2007).

Los laboratorios deben mantener los datos sobre validación de los sistemas de ensayo comerciales (kits) que utilicen. Estos datos pueden obtenerse de ejercicios de intercomparación o de datos sobre validación remitidos por los fabricantes y

sujetos a la evaluación de una tercera parte. Si no se dispone de datos sobre validación o si éstos no son plenamente aplicables, el laboratorio será responsable de completar la validación del método (ENAC, 2002).

Incluso cuando se haya realizado la validación, el laboratorio tendrá que verificar periódicamente que se cumplen los parámetros documentados, utilizando, por ejemplo, muestras inoculadas o materiales de referencia incorporados a las matrices más representativas (ENAC, 2002).

No existe un procedimiento específico para llevar a cabo una validación. Dependiendo de los alcances requeridos de la misma, se incluirán o no y analizarán a diferentes grados de profundidad los parámetros característicos, teniendo en cuenta el tiempo y los costos (Cabrera, 2015).

3.4.1 Validación primaria

La validación primaria es un proceso exploratorio que tiene la meta de establecer los límites operacionales y las características de desempeño de un método nuevo, modificado o caracterizado en forma inadecuada. Debe dar origen a especificaciones numéricas y descriptivas para el desempeño e incluir una descripción detallada y precisa del objeto de interés (Páez, 2008).

Característicamente, la validación primaria procede mediante el uso de esquemas de ensayos especialmente diseñados (Páez, 2008).

Los laboratorios que desarrollan un método “en casa” o una variante de una norma existente deben realizar los pasos de la validación primaria (Páez, 2008).

3.4.2 Validación secundaria

Demostración por experimento que un método establecido funciona de acuerdo con las especificaciones en las manos del usuario. Esta validación se denomina verificación la cual es la confirmación mediante el aporte de pruebas objetivas, de que se han cumplido los requisitos establecidos (ISO 9000:2000).

Normalmente la validación secundaria emplea formas seleccionadas y simplificadas de los mismos procedimientos empleados en la validación primaria, aunque posiblemente extendidas por un tiempo mayor. Las muestras naturales constituyen el material de ensayo óptimo y el trabajo solo requiere tratar el procedimiento dentro de los límites operacionales establecidos por la validación primaria (GTC 84, 2003).

Para un laboratorio de análisis es importante validar sus técnicas, para así optimizar sus procesos, lo cual implica reducir gastos, el tiempo de desarrollo de la técnica, y generar confiabilidad en los resultados que se emiten. De igual forma, sirve para dar cumplimiento a las normas legales pertinentes o al logro de cumplimiento de normas que aunque no son de obligatorio cumplimiento contribuyen a la credibilidad del

laboratorio y a obtener altos niveles de confiabilidad que generan confianza dentro de sus clientes (Cabrera, 2015).

3.5 Generalidades de la validación

Un adecuado proceso de validación debe desarrollarse dentro del marco de buenas prácticas de manufactura, ya que garantizan la seguridad de los datos obtenidos para poder así juzgar sobre la seguridad de un producto, permitiendo obtener una documentación confiable y segura, además, la validación permite obtener una optimización y estandarización de procesos al disminuir el tiempo muerto, reducir costos y la probabilidad de fallas (Padilla, 2007).

3.6 Tipos de validación

3.6.1 Validación prospectiva

Este tipo de validación se basa en información obtenida antes de implantar el proceso de validación. Se debe realizar un análisis de riesgos para determinar si podrían conducir a situaciones críticas; se investigan posibles causas y se determina la probabilidad de que suceda. Luego se efectúan los ensayos y se hace una valoración general; si los resultados son aceptables al final, el proceso es satisfactorio. Los procesos no satisfactorios se tienen que modificar y mejorar hasta que una nueva validación demuestre su carácter satisfactorio (Padilla, 2007).

3.6.2 Validación concurrente.

La información requerida en este tipo de validación se obtiene durante la implementación del mismo. Se debe tener en cuenta el monitoreo en proceso de las variables críticas que demuestren que el proceso está bajo control y el registro de datos sobre la marcha de los procesos (Cabrera, 2015).

Para otros autores la validación concurrente es el establecimiento de evidencia documentada para demostrar que un proceso cumple con su propósito, basados en información obtenida durante la implementación del mismo. Este es el tipo de validación aplicado al trabajo en curso (Cabrera, 2015).

3.6.3 Validación retrospectiva

Este tipo de validación se lleva a cabo por medio de la revisión y análisis de la información histórica del proceso. Se deben tomar como mínimo 20 a 30 lotes que cuenten con reportes analíticos sólidos y confiables, documentación que muestre condiciones de los procesos y estudios de reclamos de los productos, entre otros. Dentro de este tipo de validación es necesario tener en cuenta el control de la materia prima, controles ambientales, controles microbiológicos, equipos, procedimientos, métodos analíticos y especificaciones; es aplicada para productos que se encuentran en el mercado y cuyo proceso de manufactura se considera estable, además cuando por las características del producto, económicamente no se justifica hacer una validación prospectiva. La validación retrospectiva también puede ser útil en el establecimiento de las prioridades en un programa de validación (Ortiz, 2008).

3.7 Parámetros analíticos del proceso de validación

Los parámetros de rendimiento se establecen de acuerdo a la categoría a la que pertenecen el método y siguiendo los requisitos exigidos por distintos organismos internacionales que incluyen: intervalo de trabajo, linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, robustez, incertidumbre, etc.

Está implícito que los estudios para determinar los parámetros de rendimiento se llevan a cabo mediante equipos que cumplen con las especificaciones, funcionan correctamente y están adecuadamente calibrados. Igualmente el operador que realiza los estudios debe ser competente en el campo de trabajo en estudio y debe contar con suficientes conocimientos respecto al trabajo, como para poder tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones realizadas a medida que progresa el estudio (Otálora, 2005).

3.7.1. Límite de detección

Es la concentración mínima del analito que puede detectarse en una muestra, pero no es necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas.

También se conoce como mínima concentración neta detectable o límite de determinación/límite de decisión y “El mínimo contenido de analito, de existir analito presente, que se detectara y se podrá identificar” (Páez, 2008).

El límite de detección es un número, expresado en unidades de concentración (o cantidad) que describe el más bajo nivel de concentración (o cantidad) de una sustancia que puede determinarse como estadísticamente diferente del blanco (Otálora, 2005).

3.7.2 Límite de cuantificación.

El límite de cuantificación, es la menor concentración real a la cual el analito es detectado con confiabilidad, bajo condiciones específicas (Páez, 2008).

3.7.3 Exactitud.

La exactitud se puede definir con la cercanía de un resultado al valor verdadero por comparación con un valor de referencia. Los valores de referencia deben ser trazables a las normativas internacionales (Ospino, 2013).

Usualmente, la exactitud se expresa como el porcentaje de recuperación de los microorganismos mediante el método de validación (Carrillo, 2008).

3.7.4 Especificidad

Capacidad de un método de determinar inequívocamente un analito/parámetro en presencia de los otros componentes de la muestra. La especificidad puede ser afectada por la presencia de interferentes (como precursores de síntesis, impurezas, productos de degradación, entre otros) (Carrillo, 2008).

3.7.5 Precisión

Grado de correlación entre los resultados de las pruebas individuales cuando se ejecuta el método repetidamente a muestras separadas e idénticas, obtenidas a partir del mismo lote del material homogéneo (Ospino, 2013).

3.7.6 Selectividad

Es la disposición de un método a producir resultados exactos para los diferentes analitos de interés, o cuando diversos microorganismos pertenecientes al mismo grupo deben ser detectados por el método (Páez, 2008).

3.7.7 Robustez.

Disposición de un procedimiento analítico de no ser afectado o no cambiar sus resultados, debido a pequeñas variaciones en los parámetros de método; esto permite obtener información de su confiabilidad en condiciones de uso estandarizadas (Ospino, 2013).

Dentro del término precisión del método se pueden distinguir dos tipos de estudios: (Real decreto 140, 2003)

3.7.8 Repetibilidad

Se refiere a la proximidad de concordancia entre los datos obtenidos por mediciones sucesivas de una misma muestra bajo las mismas condiciones de medición. Donde estas condiciones son llamadas condiciones de repetibilidad e incluyen: El mismo procedimiento de medición, el mismo analista, el mismo instrumento de medición, utilizado bajo las mismas condiciones y un mismo lugar y tiempo. Este término puede ser expresado cuantitativamente como la dispersión de los datos (VIM, 2012).

3.7.9 Reproducibilidad

Se refiere a la proximidad de concordancia entre los datos obtenidos por mediciones sucesivas de una misma muestra pero bajo condiciones diferentes, es decir, una declaración válida de reproducibilidad requiere que se especifique la condición que cambia, tales como: principio, método, instrumento de medición, analista, patrón de referencia, lugar, tiempo. Se puede expresar en términos de dispersión (VIM, 2012).

4. METODOLOGÍA

La validación de los parámetros cuantitativos, se obtiene a partir de procedimientos establecidos y estandarizados en el LABORATORIO QC S.A.S, para el método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales y fecales en aguas de consumo humano, se utiliza el M-PT-500 (código interno) para “DETECCIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN AGAR COLINSTANT”, del LABORATORIO QC S.A.S. estipulada en el Standard Methods 22ND (9222 H) (ver anexo 10) (Rice et al., 2012).

4.1 MATERIALES

4.1.1 Reactivos

Tiosulfato de Sodio al 0.1N
Reactivo de Kovack's
Alcohol al 70%
Alcohol al 96%
Agar Chromocult
Agar plate Count
Agar Colinstant
Agar Baird Parker
Agar Cetrimide

4.1.2 Material de vidrio

Frascos Schott por 250ml
Frascos Schott por 500ml
Pipetas graduadas 10ml
Cajas de Petri de vidrio

4.1.3 Materiales estériles

Membranas para filtración con poro de 0,45 μm y diámetro de 47mm
Guantes estériles
Pipeteador
Papel kraft
Asa redonda
Asa recta

4.1.4 Cepas

Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922
Cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352
Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
Cepa de *Staphylococcus* spp.

4.1.5 Equipos

Incubadora de 30-35°C
Equipo de filtración
Bomba de vacío
Contador de colonias

Mangueras
Tijeras estériles
Vasos de filtración
Autoclave
Espectrofotómetro.

4.2 Métodos

4.2.1 Equipos e instrumental de laboratorio

De acuerdo a las políticas del laboratorio QC S.A.S se llevaron a cabo las tareas de mantenimiento y calibración de los respectivos equipo, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.2.2 Control de ambiente

Mediante la técnica de sedimentación, en cada punto se colocó una caja con agar YGC para el recuento de mohos y levaduras y una caja con agar Plate Count para el recuento de bacterias mesófilas, durante 15 minutos. Las cajas con agar Plate count fueron incubadas a 37°C +/- 2°C durante 24 horas, y las cajas con agar YGC se dejaron a temperatura ambiente durante 5 días. Finalizado el periodo de incubación, se realizó el recuento de microorganismos. Este procedimiento fue realizado cada vez que se realizaba el estudio de validación.

4.2.3 Control de superficies

Para el control de las superficies se realizaron mediante la técnica de hisopado en 10 mL de agua peptonada estéril, realizando un barrido a un área delimitada de 25 cm² en las tres principales zonas de trabajo (áreas de siembra), una vez realizado el barrido se transfiere 0,1 ml a los medios Plate Count, Chromocult, Colinstant y YGC (Agar Cloranfenicol Glucosado), con el fin de determinar la presencia de aerobios mesófilos, coliformes totales, *Escherichia coli*, mohos y levaduras. Las cajas de Petri se incubaron a 37°C por 24 horas y para mohos y levaduras temperatura ambiente por 5 días.

4.2.4 Preparación del patrón de Mcfarland

Se utilizaron diferentes volúmenes (mL) de BaCl₂ a 0,048M (1,175% P/V BaCl₂*2H₂O) a volúmenes (ml) de H₂SO₄ al 0,18 M (0,36 N) (1% V/V). Se verificó la densidad de cada estándar usando un espectrofotómetro GENESYS 20. El patrón Mcfarland 0,5 se preparó adicionando 0,05ml de BaCl₂ 2H₂O a 9,95 ml de H₂SO₄, el rango de absorbancia a 625 nm utilizado fue 0,08 a 0,10. Para la preparación de los otros patrones se aumenta el volumen de BaCl₂ 2H₂O, disminuyendo al igual el del H₂SO₄. (Mcfarland, 1907).

4.2.5 Cepas de referencia

Se caracterizan por ser cepas liofilizadas contenidas en 2 Pack, cada pack contiene una preparación de microorganismo no enumerada o cualitativa (>1000 UFC/mL), de cuarto pase proveniente del cultivo de referencia. Las cepas seleccionadas

fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

La reactivación de las cepas se realizó de acuerdo al procedimiento establecido por la casa comercial Microbiologics®, referencia KWIK-STICK™, luego de la reactivación se procedió a la estandarización del inóculo y se denominaron cepas de trabajo, adicionalmente se realizó una crio-preservación de la cepa, para este último procedimiento, se procedió a utilizar cada una de las cepas sembradas en Plate Count (tiempo de crecimiento menor a 18 horas), tomando una asada de cada una de ellas, luego se adicionó dicha asada en el medio que contiene el tubo de Cryobank (se utilizó un tubo para cada cepa reactivada); se agitó hasta incorporar completamente la muestra al medio invirtiendo el tubo, garantizando así la adhesión de las bacterias a las perlas que se encuentran dentro del tubo, Con un a pipeta estéril se removió del tubo el medio de cultivo del Cryobank, Inmediatamente después se almacenó el tubo de Cryobank a la temperatura indicada de preservación (-4°C) (Ospino, 2013).

4.2.6 Control de calidad de los medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados (Chromocult, Colinstant, Plate Count Agar, y YGC) se les realizó prueba de esterilidad y control de crecimiento de microorganismos en el medio.

Una vez preparados los medios de cultivo según las indicaciones de la casa comercial, y esterilizados a 121°C/ 15 PSI por 15 minutos, se tomó al azar el 10% de las cajas preparadas por cada lote, se incubó a 37°C por 24 horas y se reportaron resultados.

4.2.7 Control de esterilización de las autoclaves

Con el fin de verificar que los equipos estuviesen alcanzando la temperatura óptima para los procesos de esterilización, se realizaban controles con bioindicadores de *Sterikon®* plus. Terminado el proceso de esterilización se incubó a 60°C por 24 horas transcurrido el tiempo se procedió a la respectiva lectura e interpretación de resultados.

4.2.8 Control de crecimiento de microorganismos.

Fueron realizados controles positivo y negativo, utilizando cepas de referencia certificadas por la casa comercial KWIK-STICK™, a través de la implementación del método ecométrico. A partir de inóculos estandarizado de un microorganismo de interés (*E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 , microorganismo interferente *Staphylococcus* spp. y control positivo *P. aeruginosa* ATCC 9027),

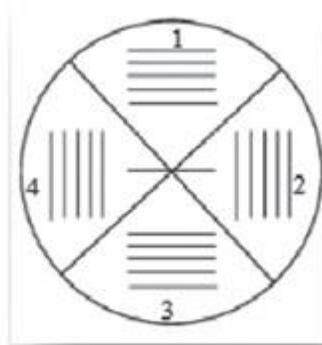
4.2.8.1 Test Ecométrico

Esta técnica permite establecer la eficiencia con que un medio de cultivo recupera o induce el crecimiento y desarrollo de una cepa de referencia. Esta diferencia se logra establecer cuando se somete un microorganismo que se desarrolla normalmente en un medio (microorganismo referente) y otro que no crece en el

(microorganismo interferente); lo que indicará el porcentaje de recuperabilidad del medio de cultivo para el microorganismo de interés

Para llevar a cabo esta técnica es necesario la siembra con un asa de 0,1 mL previamente calibrada en una caja de Petri dividida en cuatro cuadrantes, cada siembra contendrá cinco estrías y la última se realizará en el centro de la caja, sin retomar muestra. La caja se llevará a una temperatura óptima de crecimiento. (Mossel. et al, 2003).

Ilustración 1. Método ecométrico empleado para pruebas de eficacia del medio de cultivo



Es recomendable sembrar tanto el microorganismo de interés como el interferente en medio nutritivo, para detectar si alguno de estos posee problemas con su crecimiento y desarrollo y así poder descartarlos si llegasen a tener problema alguno (Mossel. et al, 2003).

Una vez pasado el tiempo de incubación lo ideal es observar crecimiento en todas las líneas realizadas. Se considera válida cualquier estría que contenga un crecimiento mayor o igual al 25%. Cada estría tiene un valor de 0,2 y la del centro un valor de 1. Todos los resultados se deben sumar para obtener el índice de crecimiento absoluto (ICA) (Mossel. et al, 2003).

Tabla 2. Interpretación del Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) para microorganismo interferente

	ICA	Interpretación
Medio de interés	0	medios altamente selectivos
	0-2,5	medios medianamente selectivos
	>2,5	medios no selectivos

(Tortora, et.al, 2007).

Tabla 3. Interpretación del Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) para microorganismos referentes o de interés

Medio de Prueba	ICA	Interpretación
	0	Medio no productivo
	<2,5	Medios pocos productivos
	2,5-4,5	Medios medianamente productivos
	4,5-5	4,5-5 medios altamente productivos

(Tortora. et.al, 2007).

4.2.9 Control negativo - muestra

Se toma una muestra de 100 ml de agua Envasada en bolsa sin inocular en presentación de 300 mL, posteriormente se lleva al área de recuentos, luego se adiciona la muestra (100 ml) a la copa de filtración y se hace pasar a través de la membrana y una vez filtrado todo el líquido se coloca la membrana sobre la superficie de una caja Petri con agar chromocult y se lleva a incubar durante 24 horas a una temperatura entre 30-35°C. Este procedimiento se realiza tres veces, por cada cepa utilizada y por cada analista.

4.2.10 Estandarización del inóculo.

Para la validación del método de Filtración por membrana para detección de coliformes totales y fecales, se analizaron dos (2) muestras de aguas para consumo humano, (envasada y potable) cada una con ocho (8) repeticiones, provenientes de diferentes clientes, para cada prueba, se realizó una prueba estándar (control positivo), en la cual se evaluó cada microorganismo por separado (agua estéril para inyección, inoculada con cada uno de los microorganismos a evaluar (*Escherchia coli* ATCC 25922, y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352), una solución de prueba (agua envasada inoculada con los microorganismos utilizados como prueba *Escherchia coli* ATCC 25922, y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352), un control negativo (agua envasada sin inocular) y una prueba combinando la muestra de agua con los microorganismos a evaluar (agua envasada + *Escherchia coli* ATCC 25922 + *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352), (agua envasada + *Escherchia coli* ATCC 25922), (agua envasada + *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352) y también se realiza el mismo procedimiento para el agua potable; para determinar posteriormente parámetros cuantitativos para la validación del método.

4.2.11 Filtración por Membrana.

Para llevar a cabo el análisis de las muestras de agua se desarrolla la técnica de filtración por membrana llevando a cabo el montaje del equipo de filtración según lo descrito por los Métodos estándar para el examen de agua y aguas residuales

(APHA-AWWA-WPCF 9222 H). Y se utilizan membranas de nitrato de celulosa, con poro de 0.45um y diámetro de 47 mm.

4.2.12 Prueba de repetibilidad. (Páez, 2008)

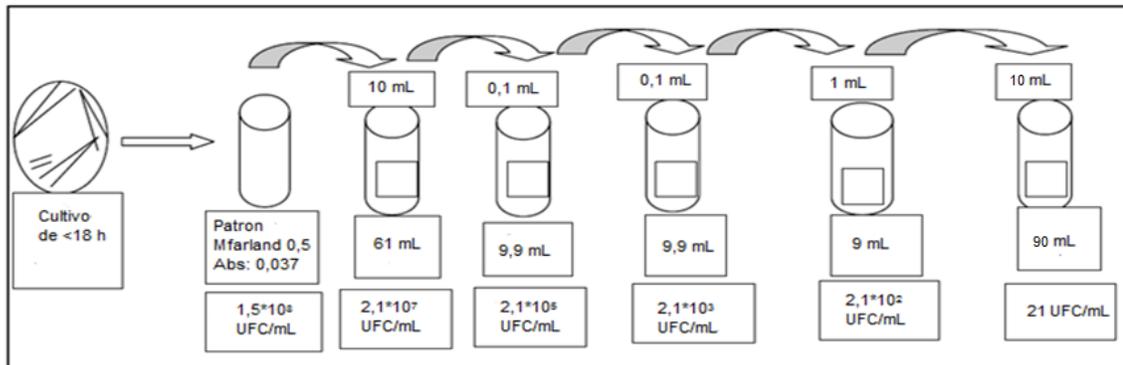
En el proceso de validación se partió inicialmente de una concentración de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL, la cual fue determinada a través de las mediciones que se realizaron en la estandarización de la lectura del tubo 0.5 de Mcfarland.

A partir de la concentración inicial se empleó la formula $V1 * C1 = V2 * C2$ para reducir la concentración bacteriana.

$$V1 = \frac{10 \text{ mL} * 150000000 \text{ UFC/mL}}{21000000 \text{ UFC/mL}} = 71 \text{ mL}$$

Luego de obtener la concentración de $2,1 \cdot 10^7$ UFC/mL se realizaron diluciones hasta 10^{-7} y se procedió de la siguiente manera:

Ilustración 2. Preparación del inoculo para realización de prueba de repetibilidad



Fuente: Carrillo y Lozano; 2008

4.2.13 Prueba de reproducibilidad (Páez, 2008).

Esta prueba se realizó de acuerdo a los procedimientos establecidos en el numeral 4.2.12 haciendo diluciones seriadas hasta la dilución $1 \cdot 10^{-6}$. Se inocularon 21 UFC aproximadamente en un Erlenmeyer con 71 mL de agua peptonada estéril pero en este caso, cambiando una de las condiciones anteriores (analista 2).

Hacer lectura de recuentos en placa realizadas por un segundo analista, además de emplear análisis estadísticos: desviación estándar, %error, %recuperación, %coeficiente de variación.

4.2.14 Prueba de robustez (Ospino, 2013).

Esta prueba se realizó a partir de la prueba de reproducibilidad, los resultados fueron leídos a la 24 y 48 horas, además de realizar las pruebas en diferentes muestras de aguas para consumo humano.

Hacer recuento de colonias típicas a las 24 horas y dejar incubar 24 horas adicionales para determinar si el tiempo de incubación afecta el crecimiento, realizar lectura de las placas nuevamente.

6.2.16 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados bajo los lineamientos del Standard Methods 22ND EDITION en el numeral 1020 para el aseguramiento de control de calidad de aguas. (Rice et al., 2012).

Se determinaron las desviaciones estándar (DS) tanto para las pruebas realizadas en la estandarización del inóculo, de tal manera que con este valor se hallaron los coeficientes de variación (CV), los cuales fueron necesarios para determinar los dos parámetros de calidad para la validación de métodos (repetibilidad y reproducibilidad). Para el cálculo de este coeficiente de variación fue necesario hallar la media de los datos (X), cada uno de estos análisis estadísticos fue realizado bajo la plataforma de Excel 2010.

$$X = \sum x/n$$

Donde:

X = Promedio de los datos

n = Número de datos

$\sum x$ = sumatoria de todos los datos

$$DS = \sqrt{\sum \frac{(x - X)^2}{n - 1}}$$

Donde:

DS : Desviación estándar

x : Dato o valor experimental

X : Promedio de los datos

n : Número de datos

$$\%CV = \frac{DS}{X} * 100$$

Donde:

CV : Coeficiente de Variación

DS : Desviación estándar

X : Promedio de los datos

A su vez se hallaron los límites de alerta (LA) y de control (LC) utilizando la desviación estándar de estos rangos.

$$LA: 2DS + X$$

Donde:

DS: desviación estándar

X: media de los datos

$$LC: 3DS + X$$

Donde:

DS: desviación estándar

X: media de los datos

Para el descarte o aceptación de datos sospechosos se empleó el método estadístico T-Student.

$$\text{Criterio T: } \frac{\text{Dato sospechoso} - \text{media}}{\text{Desviacion Standard}}$$

4.3 Actividades rutinarias en el LABORATORIO QC S.A.S

Para llevar a cabo el análisis de las muestras de agua se desarrolla la técnica de filtración como se menciona en el numeral 4.2.11 y Para llevar a cabo el análisis de las muestras de alimentos se implementaron las técnicas estipuladas en el INVIMA para alimentos listos para consumo humano; estos varían de acuerdo al tipo de alimento (ensaladas, arroz, paletas, cárnicos cocidos, jugos pulpas, entre otros), varían dependiendo del alimento y de la solicitud del cliente.

Tabla 4. Parámetros microbiológicos realizados a distintos alimentos con su respectiva norma.

Alimento	Análisis	Norma
Yogurt	Coliformes totales y fecales, Mohos y Levaduras,	Resolución 2310/86
Leche higienizada	Aerobios Mesófilos, Coliformes totales y fecales.	Decreto 616/2006
Jugos y Pulpas de Frutas congeladas	Aerobios Mesófilos, Coliformes totales y fecales, Recuento de esporas de <i>Clostridium</i> spp.	Resolución 7992/91
Refresco liquido en bolsa	sulfito reductor, Mohos y Levaduras.	
Snack	Aerobios Mesófilos, Coliformes totales y fecales, <i>Staphylococcus coagulasa</i> (+), Mohos y Levaduras.	INVIMA
Ensalada	Coliformes totales y fecales, <i>Salmonella</i> sp.	INVIMA

Cárnicos cocidos	Coliformes totales y fecales, <i>Salmonella</i> sp. Aerobios Mesófilos, <i>Staphylococcus</i> coagulasa (+), Mohos y Levaduras, Recuento de esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor.	INVIMA
------------------	---	--------

Tabla 5. Análisis microbiológicos ofrecidos en el Laboratorio QC S.A.S a los clientes para análisis de alimentos

Microorganismo	Método	Medio	Confirmación	Reporte
Coliformes totales y fecales	Tubo múltiple, campana de Durham	Caldo Brilla	Agar colinstant	NMP/g o mL
<i>Salmonella</i> sp.	Enriquecimiento o no selectivo	Caldo peptona	Agar XLD Agar Hektoen	Ausencia/ presencia
	Enriquecimiento o no selectivo	Caldo selenito-cisteína		
<i>Staphylococcus</i> coagulasa positiva	Siembra en placa en superficie	Baird Parker	Coagulasa (+)	UFC/ g ó mL
<i>B. cereus</i>		Mossel	Gram	
Aerobios mesófilos	Siembra en placa profunda	Plate Count	N.A	
Mohos y Levaduras		YGC		
Esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor	Tubo (anaerobiosis)	TSN		

N.A: No Aplica, ya que no es necesaria la confirmación

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	SEMANAS																			
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Inducción																				
Inicio de la Pasantía																				
Análisis microbiológico alimentos																				
Análisis microbiológicos aguas																				
Implementación de garantía de calidad																				
Estandarización para procedimientos de filtración por membrana																				
Estandarización de procedimientos para pruebas control de ambientes y superficies.																				
Estandarización escala McFarland																				
Reactivación cepas ATCC																				
Evaluación de la productividad y selectividad de los medios de cultivo																				
Filtración cepa <i>E. coli</i> ATCC 25922 en agar Colinstant																				

ACTIVIDADES	SEMANAS																			
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Filtración cepa <i>K. pneumoniae</i> ATCC 4352 en agar Colinstant																				
Filtración pool <i>E. coli</i> ATCC 22925 + <i>Klebsiella sp.</i> ATCC 4352																				
Prueba de repetitividad, reproducibilidad y robustez																				
Filtración muestras envasadas y potables																				
Elaboración Informe de Pasantía																				
Entrega Informe de Pasantía																				
Sustentación																				

6. RESULTADOS y ANALISIS DE RESULTADOS.

6.1 Control de ambientes y superficies

Los análisis de ambientes y superficies en el LABORATORIO QC S.A.S fueron realizados de forma semanal, buscando brindar aseguramiento de la calidad a los procesos microbiológicos que aquí se desarrollan

Tabla 6. Recuento microbiológico para mesófilos, mohos y levaduras en el área de microbiología en el laboratorio QC S.A.S

		LABORATORIO QC S.A.S									
		BITACORA DE CONTROL DE LIMPIEZA Y DESINFECCION MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTES Y SUPERFICIES									
		METODO: SEDIMENTACIÓN (Ambientes) - CONTACTO (Superficies)									
FECHA		21/03/2016	30/03/2016	02/04/2016	16/04/2016	30/04/2016	02/05/2016	16/05/2016			
DESINFECTANTE UTILIZADO		Amonio Cuaternario									
TIEMPO DE EXPOSICIÓN (10, 15 ó 20 min)		20 min									
EQUIPO O AREA A MONITOREAR	INCUBADORA BINDER WTC CODIGO: AM-007	AMBIENTES	<15 UFC/15min de exposición	0	0	0	0	0	0		
	INCUBADORA BIOBASE MODELO BJPX CODIGO: AM-021			0	0	0	0	0	0		
	NEVERA INDURAMA MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS CODIGO: AM-008			7	3	5	2	4	2	3	
	AMBIENTE AREA DE SIEMBRA	SUPERFICIE		<1 UFC/ 25cm ²	1	0	0	0	1	0	0
	AIRE ACONDICIONADO SAMSUNG				0	0	0	0	0	0	0
	MESÓN AREA DE LECTURA Y REPIQUE				0	0	0	0	0	0	0
	MESÓN AREA DE SIEMBRA AGUAS				0	0	0	0	0	0	0
	MESÓN AREA DE SIEMBRA ALIMENTOS				0	0	0	0	0	0	0

En la tabla 6, se plasman los resultados obtenidos para los siete muestreos realizados durante el proceso de validación, al momento de la realización de análisis microbiológicos para el monitoreo de los ambientes y superficies interno. Se observa que la nevera empleada para almacenamiento de medios de cultivo, presentó un crecimiento de 7 UFC para la primera semana en la que se empezó a implementar la evaluación de la calidad de ambientes, sin embargo este recuento se encuentra por debajo del rango de estipulado en el laboratorio (<15 UFC/15 min), para la garantía de calidad; es importante mencionar que este recuento obtenido disminuyo significativamente a lo largo del proceso de monitoreo de análisis de superficies y ambientes.

En los equipos (incubadoras y aire acondicionado) el crecimiento microbiano fue nulo, al igual que el recuento obtenido en las superficies de las áreas de siembras de aguas y alimentos.

Para el caso del recuento de ambientes, en el área de siembra de alimentos se obtuvo un crecimiento de 1 UFC, de igual forma este resultado se encuentra por debajo de los lineamientos estipulados dentro del laboratorio (<15 UFC/15 min) para la garantía de calidad, por tal razón este dato no se considera significativo para alterar la confiabilidad de los resultados.

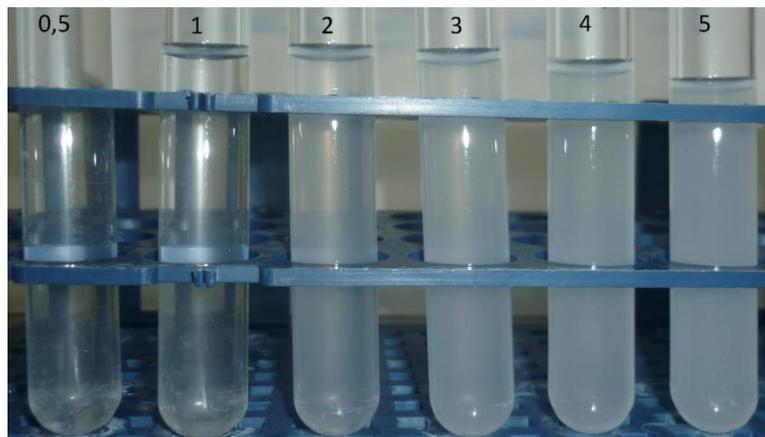
Estos resultados nos permiten garantizar que el área de trabajo presenta un ambiente seguro, siendo esto un buen indicio de que los procesos de limpieza y desinfección aplicados han sido adecuados, y por ende también podemos garantizar a los clientes el resultado de sus análisis

La realización de pruebas bajo condiciones ambientales controladas nos permite reducir la aparición de falsos positivos por contaminación cruzada, esto se garantiza con el proceso de limpieza y desinfección para el área de recuentos microbiológicos, siendo este proceso (Limpieza y desinfección) primordial para obtener resultados confiables durante la validación.

6.2 Escala de Mcfarland.

En la ilustración 3 se evidencian los resultados de la elaboración de la escala química del patrón Mcfarland, a los cuales se les realizó la respectiva lectura de absorbancia a 625 nm, estos resultados fueron plasmados en la tabla 7. De estos patrones se utilizó el patrón McFarland 0,5 para la preparación de los inóculos de trabajo, con el fin de realizar comparaciones de forma visual y espectrofotométricas a través de suspensiones microbiológicas ajustadas a un patrón químico, facilitando determinación del número de bacterias por mililitro presente en la muestra, y permitiendo obtener una concentración conocida durante la elaboración del proceso de validación

Ilustración 3. Escala química Patrón McFarland



Fuente: Autor.

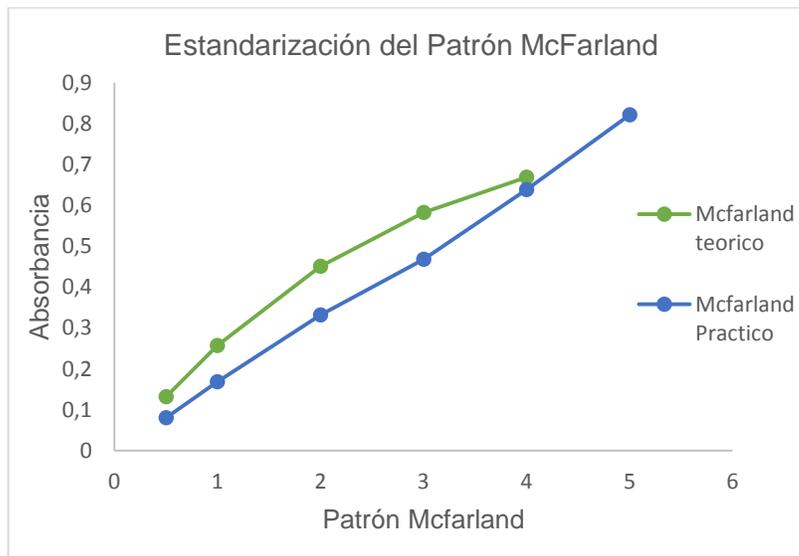
La lectura de absorbancia a 625 nm, obtenida para esta escala, fue comparada con los valores teóricos. En la tabla 7 se observan las comparaciones de las absorbancias obtenidas en el Laboratorio QC S.A.S.

Tabla 7. Absorbancias teóricas comparadas con absorbancias prácticas del Patrón McFarland

<i>Escala Mcfarland</i>	<i>Teórico (Absorbancia 625 nm)</i>	<i>Práctico (Absorbancia 625 nm)</i>
0,5	0,132	0,08
1	0,257	0,168
2	0,451	0,332
3	0,582	0,468
4	0,669	0,638
5	-	0,821

La grafica 1 nos permite evidenciar el comportamiento lineal que presentan los datos obtenidos (ver tabla 5), para el patrón teórico como practico. El laboratorio QC S.A.S determinó que se emplearía el patrón Mcfarland 0,5 debido a que la recuentos obtenidos en la siembra en placa profunda ($1.6 \cdot 10^8$ UFC/mL) coincidían con los esperados de acuerdo a la referencia teórica ($1.5 \cdot 10^8$ UFC/mL).

Grafica 1 Estandarización del patrón McFarland Vs absorbancias teóricas y prácticas.



La elaboración del patrón químico nos permitió tener una estimación teórica acerca de la concentración bacteriana inicial, importante para la realización de una correcta

validación, empleándose para la estandarización de las diferentes cepas utilizadas, y siendo verificada la concentración mediante recuento en placa.

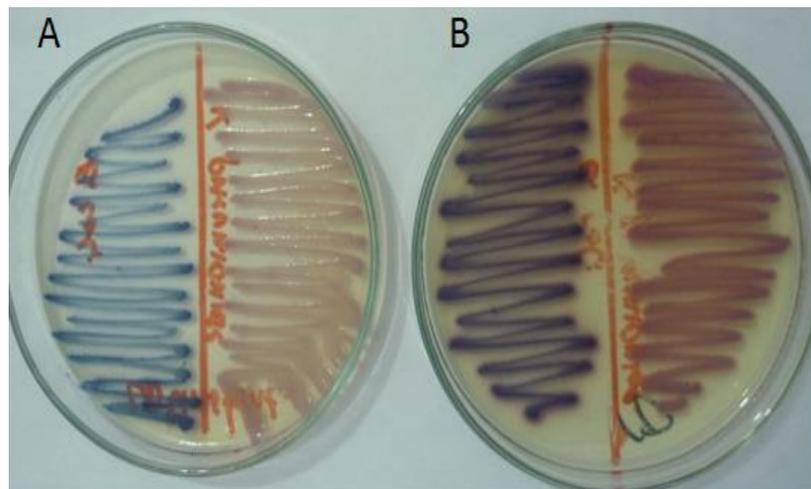
6.3 Control de calidad de los medios de cultivo

El LABORATORIO QC S.A.S ha considerado el control de calidad de los medios de cultivo uno de los puntos críticos de control, ya que dependiendo de la calidad de los medios de cultivo, aumentará la confiabilidad y calidad de los resultados que se le ofrecen al público.

El sistema de gestión de calidad del laboratorio incluye dentro de sus políticas la implementación de las buenas prácticas de laboratorio por medio de las cuales es necesaria verificar la calidad de la preparación y evaluación de los medios de cultivos, por tal razón se realiza a diario en el laboratorio control y verificación de la preparación y esterilización de medios de cultivo (Soler, 2006).

Se comprobó la calidad del medio de cultivo, al contrastar las características macroscópicas de los microorganismos de interés, según los criterios estipulados en los certificados de calidad del medio de cultivo Colinstant suministradas por la casa comercial, además de los resultados obtenidos por Ospino en 2013 (Ospino, 2013)

Ilustración 4. Crecimiento *Klebsiella pneumoniae* (Derecha) y *Escherichia coli* (Izquierda). **A.** Agar Colinstant **B.** Agar Chromocult

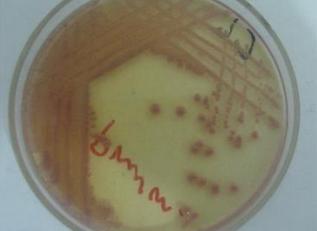


Fuente: Autor

La implementación de medios cromogénicos permite la detección de coliformes totales y fecales a partir de las características macroscópicas, siendo estas similares en ambos medios de cultivo (Colinstant y Chromocult) debido a la presencia de sustratos cromogénico. El resultado de las siembras en Agar Chromocult y Colinstant concuerda con las características típicas a nivel macroscópico descrita por las casas comerciales. Además, la adición del reactivo de KOVAC'S que permitió observar a nivel bioquímico la producción de una coloración rojiza por la

degradación del aminoácido triptófano reflejada en aquellas colonias que son INDOL (+) como lo es *Escherichia coli* (Ver tabla 8).

Tabla 8. Características morfológicas de las cepas de trabajo.

	Microorganismo	Características Macroscópicas	Prueba Confirmativa
Agar Colinstant	<i>Escherichia coli</i> ATCC 95922	 <p>Tamaño: Colonias medianas Elevación: convexas Forma: circular Borde: Redondado Color: pigmentación Azul intenso debido a que escinde ambos sustratos cromogenicos X-glucoronido y salmón GAL.</p>	 <p>Las cepas de <i>Escherichia coli</i> tienen la capacidad de desdoblar el indol del triptófano formando un complejo rosa-rojizo añadirse reactivo de Kovac's, mientras que algunas especies del género <i>Klebsiella</i> spp., no lo escinden.</p>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	 <p>Tamaño: Colonias grandes Elevación: planoconvexas Forma: circular Borde: Redondado Color: Pigmentación rojiza, debido a que solo escinde solo el sustrato salmón GAL.</p>	

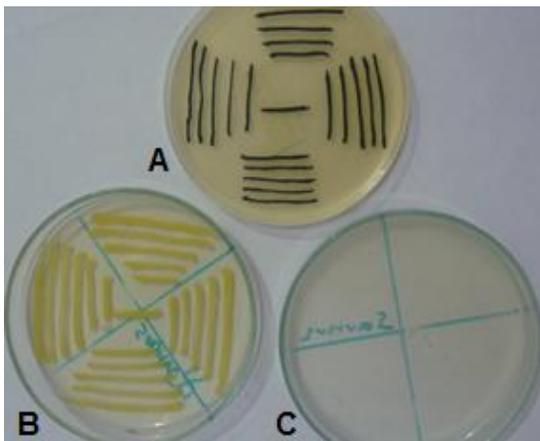
La selectividad del agar Colinstant se debe a la acción de tensoactivos, como las sales biliares que inhiben el crecimiento de casi todas las bacterias Gram positivas y otros agentes inhibidores añadidos al medio de cultivo que aumentan mayoritariamente la selectividad del medio, al igual que en el agar Chromocult.

Otras bacterias Gram negativas producen colonias incoloras como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* determinante en la evaluación de la productividad del medio de cultivo durante el proceso (ver ilustración 5) (Sharlab, 2016).

La comparación de los crecimientos de las cepas de interés (*E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 4352) y las cepas interferentes (*Staphylococcus* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*) empleando un agar selectivo y/o diferencial que permita observar las características macroscópicas propias del microorganismos y compararlas a su vez con el agar de estudio, este proceso es factible a partir de la implementación del test ecométrico verificando así la selectividad de agar implementado en este caso para la validación del método de filtración por membrana.

En la ilustración 5 se evidencia el crecimiento de la cepa interferente *Staphylococcus* spp. en agar Baird Parker y agar Plate Count, a partir del método ecométrico obteniendo un resultado de ICA de 5, esto debido a la composición química de los medios, el Baird Parker permite un crecimiento selectivo y diferencial característico de este microorganismo y el agar Plate Count, medio nutritivo para el crecimiento de microorganismos además de permitirnos observar si existe algún daño en el crecimiento microbiano, sin embargo el crecimiento de este microorganismo en el agar de interés, (Colinstant) fue nulo ya que la composición química del medio es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas por lo que el ICA en este caso es 0 (cero).

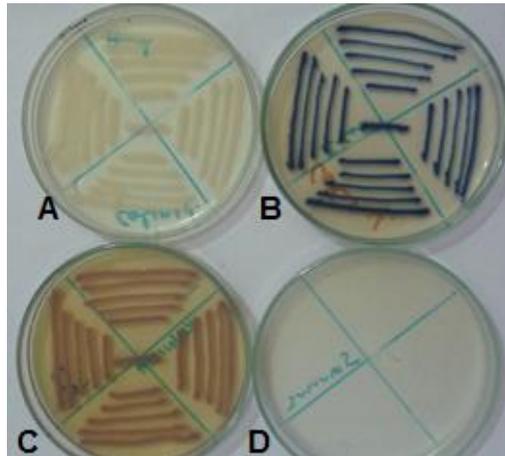
Ilustración 5. Test Ecometrico *Staphylococcus* sp. A. Agar Baird Parker, B. Agar Plate Count, C. Agar colinstant.



Fuente: Autor

La siguiente ilustración (ilustración 6) indica los índices de crecimiento absoluto (ICA) de la prueba ecométrica realizada para la evaluación de la productividad y selectividad del medio de cultivo Colinstant, utilizando las cepas *K. pneumoniae* ATCC 4352 y *E. coli* ATCC 25922 como cepa de interés, *P. aeruginosa* ATCC y *Staphylococcus* spp. como interferente.

Ilustración 6. Test Ecométrico Agar Colinstant. **A.** *Pseudomona aeruginosa*, **B.** *Escherichia coli*, **C.** *Klebsiella pneumoniae* **D.** *Staphylococcus* spp.

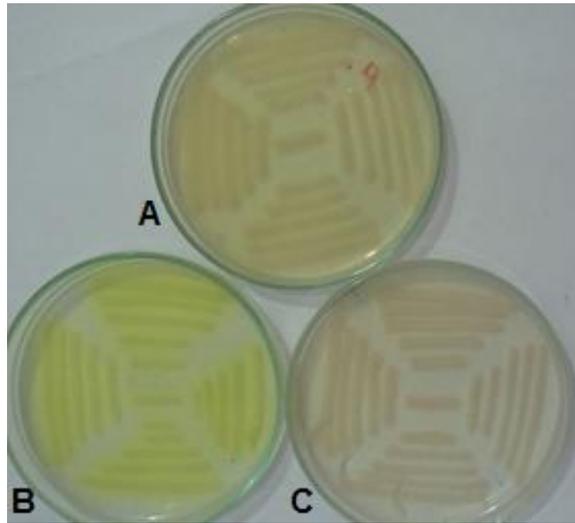


Fuente: Autor

La composición química del medio permite evaluar la productividad en el medio de cultivo para los resultados del ICA: 5 para el caso de los microorganismos de interés, además del crecimiento de otros Gram negativos, en este caso *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo la pigmentación de este microorganismo permite una fácil diferenciación ante los microorganismos de interés, La gran ventaja de este medio es que al ser cromogénico, permite la detección del grupo de enzimas que son características para los coliformes totales β -galactosidasa y la β -D-glucoronidasa exclusiva de *E. coli* lo cual lo hace un medio de cultivo altamente diferencial y específico.

El método ecométrico realizado al agar Cetrimide (ilustración 7) se realizó con el fin de determinar la selectividad y especificidad del medio de cultivo a través de la utilización de la cepa de control *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Ilustración 7. Test Ecométrico: A. Agar Plate Count, B. Agar Cetrimide, C. Agar Colinstant empleando la cepa *Pseudomonas aeruginosa*.



Fuente: Autor

La figura 7 representa los resultados del ICA: 5 del método ecométrico obtenidos para el caso del microorganismo interferente *Pseudomonas aeruginosa*, realizado con el fin de verificar la productividad y selectividad del medio de cultivo de interés (Colinstant), en este caso se utilizó *P. aeruginosa* como control positivo, el cual se sembró en agar PCA para asegurar que el microorganismo no presentara problemas en su crecimiento, además se utilizó un medio selectivo y diferencial (Cetrimide) donde el microorganismo pudiese crecer sin dificultades.

6.4 Prueba de esterilidad de los medios de cultivos.

Las cajas con medios de cultivo seleccionadas al azar no presentaron crecimiento de ningún microorganismo después del tiempo establecido para la incubación (se tomó el 10% de cada lote de medios de cultivo para el análisis de esterilidad). Las instrucciones de la casa comercial de los medios de cultivo no recomienda ningún método para la verificación de la presencia de mohos y levaduras, aunque para el descarte de la presencia de estos microorganismos en el medio de cultivo estos se dejaron por 7 días, para mayor seguridad, los resultados nos indicaron ausencia total de mohos y levaduras.

6.5 Control de esterilización de las autoclaves

Los controles de esterilización en las autoclaves son realizados cada 15 días, para garantizar los resultados de la validación durante el tiempo del proceso, y para garantizar los resultados de los clientes.

La revelación de las ampollas de *Sterikon®* plus, para evaluar efectividad de los autoclaves indicó que las esterilizaciones realizadas en el Laboratorio fueron

satisfactorias, es decir, durante el proceso de esterilización la temperatura fue igual o superó los 121°C, además de emplear un tiempo controlado de 15 minutos, confirmando que la esterilización del material fue suficiente. De igual manera los controles de esterilidad realizados a los diferentes medios de cultivo verifican que la autoclave eliminó efectivamente los microorganismos que pudiesen alterar los resultados (Ver anexo 11).

6.5 Control negativo – (Blancos)

La filtración por membrana de muestras sin inocular o también llamados blancos no presentaron crecimiento de ningún tipo de microorganismo que pudiese interferir en el resultado de la validación, por lo que los siguientes procedimientos no iban a presentar ninguna alteración adicionada por las muestras (Ver figura 8).

Ilustración 8 . Filtración por membrana de muestras sin inocular (Blancos), ausencia de crecimiento.



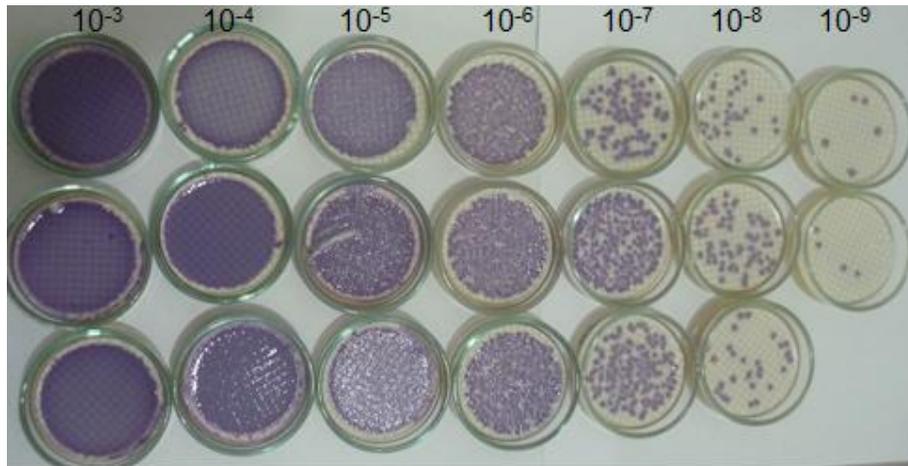
Fuente: Autor

6.7 Estandarización del inculo y de la técnica de filtración por membrana.

La figura 9 nos da una orientación del resultado del proceso de estandarización del inculo implementando la técnica de filtración por membrana,

Es importante mencionar antes de comenzar el proceso de filtración de muestras con inculo, se realizó recuento en placa en profundidad en agar Plate Count, con el propósito de conocer las concentraciones de las diluciones y verificar la concentración teórica del patrón Mcfarland. Estos resultados fueron omitidos debido a que los resultados obtenidos en el recuento en placa fueron muy similares a los conseguidos en el proceso de filtración por membrana.

Ilustración 9. Resultado de la filtración por triplicado de diluciones seriadas del patrón Mcfarland 0,5.



(Fuente Autor)

Datos de los recuentos por triplicado se obtuvieron a partir de la estandarización del inoculo de las cepas certificadas *K. pneumoniae* 4352 y *E. coli* 25922.

Para este caso no fue necesario la realización del proceso de filtración de las diluciones más concentradas como es el caso de 10⁻¹ y 10⁻² debido a que las altas concentraciones de microorganismos serían muy numerosas para contar (TNTC) de igual forma se obtuvo estos resultados desde la dilución 10⁻³ hasta 10⁻⁶ (ver Anexo 8).

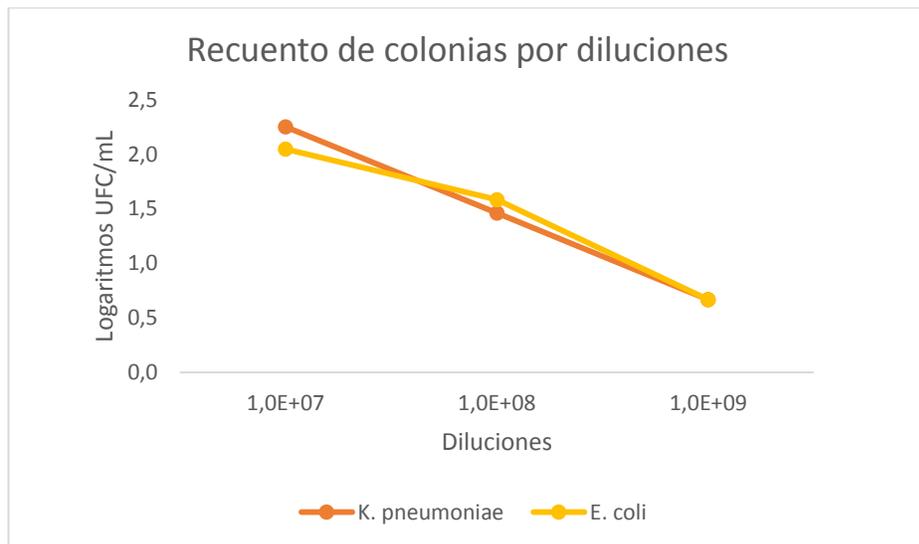
Los datos tomados para la verificación de la linealidad del método fueron los que se encontraron dentro del rango estipulado para el recuento en placa de colonias típicas 10- 200 según la NTC 4092, lo anterior teniendo en cuenta que a valores inferiores no es confiable emitir un resultado cuantitativo por lo que su evaluación debe realizarse cualitativamente por el método de (presencia/ausencia). Por el contrario si los recuentos son muy elevados tienden a presentar crecimientos confusos sobre la membrana, lo cual no permite diferenciar la separación entre las colonias.

Tabla 9. Formato de validación microbiología para verificación de reporte de datos de acuerdo a la NTC 4092

	LABORATORIO QC S.A.S					
	FORMATO DE VALIDACION MICROBIOLOGIA					
Fecha: 20/03/2016			Matriz: Agua Destilada Esteril			
Analista: María Angélica Vergara Pabuena			Tipo de muestra: Patrón Mcfarland 0,5 (Concentracion final 21 UFC)			
Metodo: Coliformes Totales y Fecales			Equipos: Filtración por Membrana			
Reactivos: Agar Colinstant						
Microorganismo	Diluciones	Promedio de Recuentos Practicos	Log ₁₀ Recuentos	Desviacion estandar	Coefficiente de variacion	
<i>K. pneumoniae</i>	10 ⁻⁷	178	2,2496	8,08	4,55	
	10 ⁻⁸	29	1,4624	2,65	9,12	
	10 ⁻⁹	5	0,6690	1,00	20,00	
<i>E. coli</i>	10 ⁻⁷	112	2,0479	10,41	9,32	
	10 ⁻⁸	38	1,5836	3,51	9,16	
	10 ⁻⁹	5	0,6690	2,08	44,61	
Observaciones: De acuerdo a lo estipulado en la NTC 4092 se tomo como referencia el rango 10 - 300 UFC para reccuento de colonias típicas.						

De acuerdo con los datos obtenidos a partir de las diluciones seriadas se puede deducir que las diluciones aconsejables para trabajar se encuentran 10⁻⁷= 112 y 178 UFC y 10⁻⁸= 38 y 29 UFC para ambos microorganismos *K pneumoniae* y *E. coli* respectivamente (ver Gráfica 2), no sería aconsejable trabajar con diluciones mayores, ya que dificultan los recuentos realizados por posibles solapamiento entre las colonias, ni tampoco con concentraciones bajas ya que existe la posibilidad de obtener crecimiento alguno de los microorganismos.

Grafica 2. Recuentos obtenidos por el método de filtración por membrana



En la gráfica 2 se observan los resultados graficados en términos de logaritmo en base 10, pues estudios realizados con anterioridad indican que el crecimiento de los microorganismos no se comportan por distribución normal por tal motivo se hizo necesario realizar esta conversión de los recuentos, para así linealizar y poder utilizar las herramientas estadísticas en la expresión de resultados por medio de gráficas, facilitando el análisis del comportamiento de los datos.

Esta grafica 2 fue realizada a partir de los datos tabulados en la tabla 9, donde se pudo comparar la linealidad de las cepas de trabajo *E. coli* y *K. pneumoniae*. También podemos evidenciar los recuentos obtenidos en ambas cepas empleadas mantienen dicha linealidad.

6.8 Repetitividad y Reproducibilidad

Las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad constó de un análisis denominado para esta validación patrón bajo (21 UFC), tal como lo estipula el IDEAM, para acreditar los parámetros ofrecidos por los Laboratorio.

Cada una de las etapas del proceso fue realizado con 8 réplicas, utilizando las dos cepas de referencia mencionadas en los ensayos anteriores. Además se utilizaron muestras de aguas potables y envasadas suministradas por diferentes clientes al laboratorio. Con los recuentos obtenidos para el patrón bajo y por cada analista se construyeron las tablas 10, 11 y 12.

En la siguiente tabla (tabla 10) se muestran los resultados obtenidos en el proceso de filtración por membrana, a los cuales se les adicionó un valor aproximado de 21 UFC para cada microorganismo de interés. Tanto los ensayos de repetibilidad como los de reproducibilidad fueron analizados a las 24 y 48 horas de incubación. La repetibilidad se realizó con un analista, mientras que la reproducibilidad fue evaluada con dos analistas.

En el caso del pool no se realizaron análisis estadísticos debido a que estos fueron adicionados de forma cualitativa, con el fin de observar el crecimiento simultáneo de ambos microorganismos, como está estipulado en el Standard Methods numeral 9222 H (Rice et al., 2012).

Tabla 10. Formato de analisis para el metodo de filtracion por membrana para repetibilidad y reproducibilidad por diferentes analistas

		LABORATORIO QC S.A.S														
		FORMATO DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD MICROBIOLOGIA														
Fecha:		17-abr-16								Matriz:		Agua Peptona Estéril				
Analista:		1. María Angélica Vergara Pabuena 2. María Cristina Gómez Cadavid								Tipo de muestra: Patrón Mcfarland 0,5 (Concentracion final 21 UFC)						
Metodo:		Coliformes totales y Coliformes fecales								Equipos: Filtración por Membrana						
Norma:		Standard Methods 9222 H								Reactivos: Agar Colinstant						
Analista/ Horas	N°Ensayos/Parámetro	1	2	3	4	5	6	7	8	Promedio	Desviación Estandar	Coefficiente de variación (%)	% Error	% Recuperacion		
1 (24 Horas)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23	20	18	18	23	26	27	17	22	3,8	17,8	4,8	102		
1 (48 Horas)		23	20	18	18	23	26	27	17	22	3,8	17,8	4,8	102		
2 (24 Horas)		21	22	15	27	18	20	17	19	20	3,6	18,3	4,8	95		
2 (48 Horas)		21	22	17	27	19	20	17	20	20	3,2	15,7	4,8	97		
Reproducibilidad										20,81	0,8	3,9	4,8	99		
1 (24 Horas)	<i>Escherichia coli</i>	27	25	21	23	19	23	19	19	22	3,0	13,6	4,8	105		
1 (48 Horas)		27	25	22	23	20	23	19	19	22	2,8	12,4	4,8	106		
2 (24 Horas)		27	20	18	20	26	23	20	25	22	3,4	15,3	4,8	107		
2 (48 Horas)		27	22	18	20	26	23	20	25	23	3,3	14,4	4,8	110		
Reproducibilidad										22	0,4	1,9	4,8	107		
1 (24 Horas)	<i>K. pneumoniae</i>	4	6	6	5	7	4	9	6	6						
	<i>E. coli</i>	18	12	16	24	20	18	21	24	19						
1 (48 Horas)	<i>K. pneumoniae</i>	4	7	7	6	7	5	9	6	6						
	<i>E. coli</i>	20	21	18	19	22	17	16	22	19						
2 (24 Horas)	<i>K. pneumoniae</i>	7	7	6	6	3	8	5	4	6						
	<i>E. coli</i>	21	21	19	19	22	18	17	23	20						
2 (48 Horas)	<i>K. pneumoniae</i>	8	7	7	6	4	8	6	4	6						
	<i>E. coli</i>	22	21	20	19	22	18	18	23	20						

En las siguientes Tablas se plasman los resultados obtenidos empleando agua potable (tabla 11) y agua envasada (tabla 12) para la validación del método empleado. Las diferentes matrices fueron suministradas por los mismos clientes del laboratorio QC S.A.S.

Se realizó análisis microbiológico a ocho (8) muestras adicionadas con el fin de verificar la precisión del método a partir de repetibilidad y reproducibilidad, como también la especificidad del método como porcentaje de error y la exactitud por medio del cálculo de la media aritmética.

Estas tablas a su vez nos permite evidenciar los cálculos de promedios, desviación estándar, coeficiente de variación para recuento de *K. pneumoniae* y *E. coli* en aguas para consumo humano. Estos cálculos facilitan a su vez la determinación de la dispersión de los datos con respecto a la concentración teórica esperada (21 UFC), a partir de 24 y 48 horas de incubación, a través del cual nos indica que valores obtenidos en los recuentos no se ven afectados por el tiempo de incubación

Con el fin de representarlas condiciones propias de crecimiento de coliformes totales y fecales, se empleó agua potable (ver tabla 11) y agua envasada (Tabla 12).

Se realizó el proceso de filtración por membrana para cada microorganismo por separado, de igual forma se realizó de forma cualitativa una suspensión bacteriana que presentaba una concentración desconocida de ambos microorganismos y se procedió a filtrar, esto con el fin de verificar la detección simultanea del ambos coliformes, y verificar las diferencias macroscópicas que estos microorganismo presentan en un medio cromogénico, tal como se especifica en el numeral 9222 H del Standard Methods (ver anexo 7). (Rice et al., 2012)

Tabla 11. Validación del método de filtración por membrana utilizando una fuente natural de agua para consumo humano (potable)

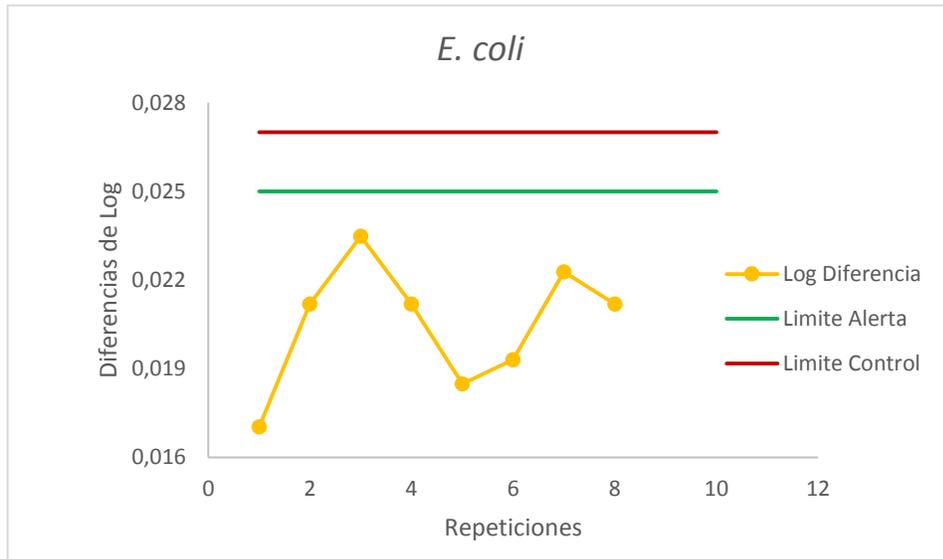
		LABORATORIO QC S.A.S													
		FORMATO DE VALIDACION MICROBIOLOGIA													
Fecha:	17-abr-16							Matriz:	Agua Potable						
Analista:	1. María Angélica Vergara Pabuena							Tipo de muestra: Patrón Mcfarland 0,5 (Concentración final 21 UFC)							
Método:	Coliformes totales y Coliformes fecales							Equipos:	Filtración por Membrana						
Norma:	Standard Methods 9222 H							Reactivos:	Agar Colinstant						
Analista/ Horas	N°Ensayos/Par ametro	1	2	3	4	5	6	7	8	Promedio	Desv. Estandar	Coef. de variación	% Error	% Recuperacion	
1 (24 Horas)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17	28	20	18	19	26	18	19	21	4,07	20	4,76	99,32	
1 (48 Horas)		18	28	20	18	19	26	18	19	21	3,96	19	4,76	100,00	
Reproducibilidad										20,93	0,10	0	0,34	99,66	
1 (24 Horas)	<i>Escherichia coli</i>	15	21	22	21	16	22	21	19	20	2,93	15	6,55	93,45	
1 (48 Horas)		15	21	24	21	17	22	21	19	20	3,08	15	4,76	95,24	
Reproducibilidad										19,81	0,27	1	5,65	94,35	

Tabla 12. Validación del método de filtración por membrana utilizando una fuente natural de agua para consumo (envasada)

		LABORATORIO QC S.A.S													
		FORMATO DE VALIDACION MICROBIOLOGIA													
Fecha:	17-abr-16							Matriz:	Agua Envasada						
Analista:	1. María Angélica Vergara Pabuena 2. María Cristina Gómez Cadavid							Tipo de muestra: Patrón Mcfarland 0,5 (Concentración final 21 UFC)							
Metodo:	Coliformes totales y Coliformes fecales							Equipos:	Filtración por Membrana						
Norma:	Standard Methods 9222 H							Reactivos:	Agar Colinstant						
Horas	N°Ensayos/Parámetro	1	2	3	4	5	6	7	8	Promedio	Desv. Estandar	Coef. de variación (%)	% Error	% Recuperacion	
24 horas	<i>Escherichia coli</i>	18	19	26	20	18	22	20	21	20	3	13	4,76	97,28	
48 horas		18	19	22	23	20	22	21	19	21	2	9	4,76	98,64	
Repetibilidad										21	0	0,98			
(24 Horas)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22	23	18	21	23	17	19	20	20	2,26	11	2,98	97,02	
(48 Horas)		22	23	18	21	23	18	19	20	21	2,23	11	2,38	97,62	
Repetibilidad										20,44	0,09	0,43			

La realización de gráficos de control nos permite realizar seguimiento al ensayo, con el fin de observar de manera más clara la tendencia de los datos.

Grafica 3. Gráfico de control de precisión.

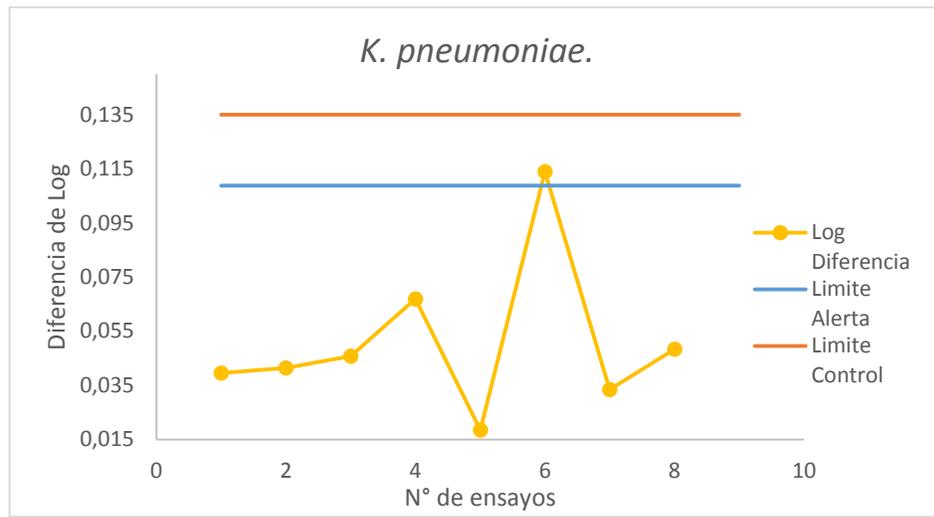


Al graficar los datos obtenidos en la carta de control de precisión (ver anexo 9) podemos evidenciar cual es el comportamiento de los datos, y por ende verificar si es necesario la realización de acciones correctivas cuando estos sobrepasan el límite de alerta más de tres veces.

Para el caso de *E. coli* se observa que ninguno de los valores obtenidos para este parámetro no es mayor al límite de (0,225), e igualmente al límite de control (0,227); a diferencia del comportamiento obtenido para la cepa de *K. pneumoniae* en donde uno de sus datos sobrepasó este límite, permitiéndonos verificar si los siguientes datos siguen el mismo comportamiento, o por el contrario estos resultados se mantienen bajo un comportamiento aleatorio, para este microorganismo los siguientes datos mantuvieron el comportamiento aleatorio, por lo que no fue necesario la realización de una acción correctiva.

En la siguiente gráfica (grafica 4) se observa que el dato obtenido para el ensayo 6 se encuentra por encima del límite de alerta, pero por debajo del límite de control lo cual indica que no es necesario realizar acciones correctivas, pero hay que hacerle seguimiento a los próximos datos, para eliminar la posibilidad de una no conformidad en el proceso, o dado el caso, la repetición del ensayo.

Grafica 4. Gráfico de control de precisión.



Los ensayos realizados en el laboratorio son evaluados a través de la implementación de gráficos carta de control, ya que son una medida estadística que permite visualizar la desviación de los datos, según lo estipulado en el Standard Methods numeral 1020. Para mejoramiento de la garantía de la calidad de los laboratorios de análisis de aguas (Rice et al., 2012).

Para la verificación de estos datos se debe tener un criterio de dos (2) desviaciones estándar para el cálculo del límite de alerta; los datos obtenidos dentro de este rango nos permiten tener un 95% de confianza, a través del cual se puede disminuir la aceptación de datos erróneos o muy desviados (Rice et al., 2012).

Para el límite de control se tiene el criterio de tres (3) desviaciones estándar, para tener un nivel de confianza de 99%, en donde la aceptación de más datos puede aumentar la desviación de los mismos y por ende afectar la variación del proceso según lo estipulado en el Standard Methods numeral 1020 (Rice et al., 2012).

El estándar de calidad Supplement Pharmacists' Pharmacopeia USP 31 en el 2008 estipuló que los porcentajes de recuperación de microorganismos inoculados debe ser >70%, posteriormente Menéndez en el 2013 indica que para que el método sea considerado exacto el porcentaje de recuperación obtenido en un ensayo debe encontrarse entre el 70 y el 120%, de acuerdo con los anteriores estudios y los resultados obtenidos durante la validación del método de filtración por membrana realizado en el Laboratorio QC S.A.S. el porcentaje de microorganismos recuperados se encuentran por encima del 70%, en un rango que varía de 94% a 110%, lo cual nos indica que ninguno de los recuentos obtenidos se sale de los límites establecidos para la recuperación de microorganismos, además de encontrarse muy cercanos al valores estipulados por el IDEAM para acreditación de estos parámetros (%recuperación para Coliformes totales y *E. coli* 127%).

El grado de confianza obtenido a través de la documentación (formatos de validación, repetibilidad y reproducibilidad) realizado para el mejoramiento continuo de los procesos de garantía de calidad al interior del Laboratorio QC S.A.S permitió determinar que la validación del método de filtración por membrana reunía las características específicas para obtener y brindar resultados confiable y seguros, para esto fue necesaria la identificación de los factores que pueden afectar la validez de la prueba (cambio de analista) empleando aguas de consumo humano (potable, tratada y envasada). La implementación de métodos estadísticos permitió la verificación de precisión, exactitud y confiabilidad del método.

La especificidad del método fue evaluada como porcentaje de recuperación, el cual nos permitió determinar la relación existente entre la media aritmética y la concentración teórica esperada (21 UFC) en cada uno de los recuentos. Para el caso de la utilización agua potable como matriz se obtuvo una recuperación de 97% y 102%, para el recuento de *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente.

Al igual que el análisis de especificidad realizado implementando agua envasada en donde el porcentaje de recuperación fue muy similar para ambos microorganismos (97%) cumpliendo con los porcentajes estipulados por Menéndez en el 2013.

Al establecer la reproducibilidad y la repetibilidad del método, se observó un notable grado de precisión dentro y entre los analistas, con lo anterior se confirma que la técnica de filtración por membrana no se ve afectada, siempre y cuando los analistas realicen los ensayos de acuerdo con los lineamientos que se estipulan en el Standard Methods para el procedimiento de filtrado y sembrado, con esto se demuestra que el método no solo es repetible sino también reproducible.

La realización de pruebas de ensayo para validaciones y acreditaciones implica la implementación de un método estadístico que permita la aceptación o el rechazo de los datos obtenidos, ya que a través de esto se permite tener un grado de confianza de alto. El Laboratorio QC S.A.S implementa en cada uno de sus análisis el criterio T (T- student) que permite tener un 95% de confianza en cada resultado.

Para el método de filtración por membrana no fue necesario el descarte de ningún dato obtenido en los ocho (8) ensayos realizados para determinación de repetibilidad y reproducibilidad, ya que estos no superaron el T-crítico estipulado por el método (2,03) para ocho (8) muestras.

La aceptación de los datos conlleva a la determinación u obtención de la repetibilidad y reproducibilidad en términos de % de coeficiente de variación (%CV) observándose con estos valores la variación que presentan cada una de los ensayos del método con respecto al valor esperado (21 UFC), sin embargo los sistemas de garantía de calidad de cada laboratorio establecen de acuerdo al tipo de ensayo realizado (físicoquímico o microbiológico) el %CV ideal para cada prueba. El %CV para validación de pruebas microbiológicas corresponde a 20% por lo que los resultados obtenidos a lo largo del proceso cumplen con las normas internas del laboratorio. Las posibles variaciones obtenidas al momento de las estimaciones estadísticas pueden deberse a variabilidad entre microorganismos, ya

que algunas características como la motilidad, pueden hacer que estos se concentre más en alguna porción de la muestra. También el grado de estrés puede ser diferente por estar el inóculo almacenado en condiciones de temperaturas bajas, entre otros factores. Además, existe variabilidad entre el grado de contaminación de las matrices y la interacción del microorganismo de interés con la microflora acompañante, la cual pudiera tener, también, un efecto en la distribución de este en la muestra según lo planteado por Ortega et al, 2010 y Tillet y Lightfoot, en 1995.

Ya que uno de los objetivos principales de esta validación es acreditar la determinación de coliformes totales y *E. coli* a través del método de filtración por membrana empleando agar Colinstant bajo la norma ISO 17025, y siguiendo con los lineamientos estipulados por el IDEAM, en donde se establece que la validación del método de filtración por membrana en agar cromogénico debe realizarse a través de la evaluación de un patrón bajo (≤ 50 UFC) y un patrón medio (≤ 200 UFC) por tal razón el Laboratorio QC S.A.S implemento la prueba para la verificación de los parámetros antes mencionados con 21 UFC

6.8.2 Robustez

La robustez del método fue verificada a lo largo del proceso de validación, en donde el crecimiento microbiano no se vio afectado por los tiempos de incubación, es decir, en promedio los recuentos realizados a 24 y 48 horas son estadísticamente semejantes, por ende el tiempo de incubación no es una variable que afecte los resultados del método de filtración por membrana; por lo que se puede decir que el método implementado es robusto; sin embargo, el aumento en el tamaño de las colonias es uno de los mayores inconvenientes durante este proceso, debido a que al momento de emplear el recuento de colonias con una concentración mayor, este puede generar solapamientos luego de 24 horas de incubación al igual que los resultados obtenidos por Ospino en 2013.

6.9 ACTIVIDADES RUTINARIAS EN EL LABORATORIO QC S.A.S

El laboratorio QC S.A.S brinda análisis microbiológicos a sus clientes en aguas y alimentos, con el fin de garantizar que los procesos de manipulación e higiene de los productos es la adecuada, además de esto también realiza análisis a aguas, en donde se incluyen aguas potables, tratadas, piscinas, envasadas y crudas siendo estas últimas la menos solicitadas y evaluada a través del método de tubo múltiple en donde solo se realiza análisis de coliformes totales y fecales.

Tabla 13. Balance mensual de la cantidad de parámetros microbiológicos ofrecidos en el Laboratorio QC S.A.S a los clientes para análisis de alimentos y aguas

N° de analisis realizados a alimentos.						
Mes/Parametro	Coliformes totales y fecales	<i>Staphylococcus</i> coagulasa positiva	Esporas <i>Clostridium</i> sp. Sulfito Reductor	<i>Salmonella</i> sp.	Mohos y Levaduras	Mesofilos
Febrero	26	14	10	14	7	20
Marzo	24	14	8	12	6	18
Abril	30	12	9	5	7	18
Mayo	35	16	11	13	8	20
Total	115	56	38	44	28	76
N° de analisis realizados a aguas.						
Mes/Parametro	Coliformes totales y fecales	Mesofilos	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	Heterotrofos		
Febrero	137	35	11	6		
Marzo	107	31	17	13		
Abril	88	35	18	14		
Mayo	142	38	20	15		
Total	474	139	66	48		

La verificación de la calidad del agua es realizada de forma diaria en el laboratorio siendo los coliformes totales y fecales los más solicitados, seguido por los mesófilos (aguas envasadas, tratadas y potables) y *Pseudomonas aeruginosa* que es realizado a las muestras de aguas de piscinas y envasadas.

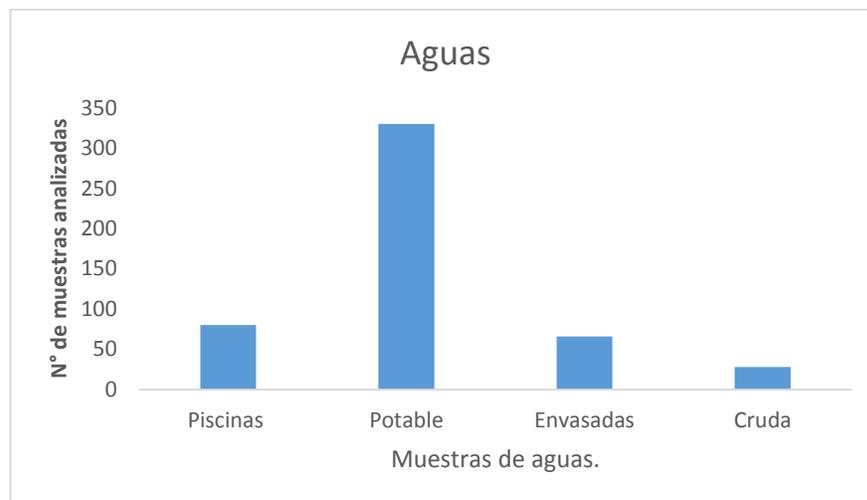
La grafica 5 es una representación del total de las muestras analizadas en los meses de febrero, marzo, abril y mayo en donde se evidencia que el 31% de las muestras que son llevadas al laboratorio en este tiempo se les realiza análisis de coliformes totales y fecales bajo la técnica de tubo múltiple, seguida del recuento de mesófilos a través de recuento en placa profunda con un 22% del total de los análisis, también se realiza con una alta frecuencia análisis de ausencia o presencia de *Salmonella* spp. en 25 g de producto, entre otros. Estos parámetros van a variar de acuerdo al alimento a analizar y los análisis microbiológicos establecidos por el INVIMA además de las exigencias de los clientes.

Grafica 5. Diferentes alimentos analizados en el laboratorio QC S.A.S.



El alimento analizado con mayor frecuencia en el laboratorio QC S.A.S. es el jugo, seguido por las ensaladas, el energético (también conocidos como alimentos ricos en carbohidratos), y por último los pasabocas y los derivados lácteos, siendo de todos estos las ensaladas el alimento que ha presentado contaminación microbiana del tipo coliformes totales y fecales, incumpliendo con lo establecido por el INVIMA (9 UFC) para considerarse aptas para el consumo humano, probablemente esto se debe a que son alimentos muy manipulados antes de consumir, sin descartar que no presentan ningún tipo de cocción, por lo que han sido catalogadas en el laboratorio como un riesgo para la salud de los consumidores.

Grafica 6. Diferentes tipos de aguas analizadas en el laboratorio QC S.A.S



El análisis microbiológico de aguas ha permitido el reconocimiento del laboratorio en la región, siendo el agua potable o tratada (analizada bajo la resolución

2115/2007) a la que mayoritariamente se le realizan estos análisis, esto debido a que es empleada tanto para el consumo humano, como para las labores bananeras de la región, seguido de las aguas recreacionales (analizada bajo la resolución 1618/2010), envasadas (analizada bajo la resolución 12186/1991), y por último las aguas crudas (analizada bajo la Decreto 1575/2007) destinadas para consumo. Los análisis realizados a las diferentes tipos de aguas indican que las aguas de consumo humano analizadas en el Laboratorio QC S.A.S son aptas para consumo humano ya que cumplen con los requisitos establecidos por cada una de las normas (0 UFC). Los datos no fueron graficados, ni tabulados debido a que hacen parte de la confidencialidad del laboratorio.

7. CONCLUSIONES

La evaluación de las condiciones microbiológicas de los alimentos indican que un 85% de las muestras analizadas en el laboratorio QC S.A.S de alimentos y aguas a los distintos clientes son aptas para consumo humano, al cumplir con los parámetros estipuladas por el INVIMA y la resolución 2115 de 2007, respectivamente.

La técnica de filtración por membrana demostró ser una técnica fácil, rápida y confiable para la obtención de los resultados empleando el Agar Colinstant, en el cual se obtienen recuentos en menos tiempo, gracias a la presencia de enzimas propias y específicas del microorganismo.

La implementación de la técnica de filtración por membrana realizada en el Laboratorio QC S.A.S es exacta, precisa y reproducible, lo que se comprobó al evaluar los coeficientes de variación inferiores al 20%, concluyendo que los resultados no varían significativamente por el cambio en el analista.

Los valores de repetibilidad y reproducibilidad, permitieron establecer un porcentaje de recuperación de los microorganismos de interés cercano 100% para las muestras de agua potable y agua envasada en la validación realizada en el Laboratorio QC S.A.S

Los resultados obtenidos con la simulación de las condiciones normales de un agua natural evaluadas cualitativamente y empleando un pool bacteriano, evidenciaron las dos coloraciones típicas de las colonias presentadas sobre el Agar Colinstant.

8. RECOMENDACIONES O SUGERENCIAS

Es indispensable que la persona que tome este estudio como referente realice análisis en muestras de aguas naturales como es el caso de aguas crudas, para que así contribuya a darle mayor peso a esta prueba de validación, que debido al corto tiempo en que se ejecutó solo se trabajó muestras adicionadas de aguas envasadas y potables.

Debido al corto tiempo en que se ejecutó no se pudo realizar la incertidumbre, por lo que es recomendable la verificación de incertidumbre, para tener una mayor confiabilidad para los resultados.

Es necesario que el personal que implemente dicho método deben contar con el suficiente conocimiento y experiencia para la ejecución correcta de la técnica de filtración por membrana.

9. GLOSARIO

Exactitud: porcentaje de recuperación frente al valor del inóculo.

Límite de detección y cuantificación: están implícitos y no precisan por lo general de una determinación especial.

Precisión: es la medida de error indeterminado del método, siendo los conceptos de repetibilidad, precisión, precisión intermedia, y reproducibilidad, equivalentes a los utilizados en química. Debido a la mayor variabilidad de los sistemas microbiológicos, los límites aplicables a la exactitud son mucho más amplios.

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...)

Robustez: Medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales.

Selectividad: Describe la habilidad de un procedimiento analítico para diferenciar entre varias sustancias en la muestra y es aplicable a métodos en los que dos o más componentes son separados y cuantificados en una matriz compleja.

Validación: Confirmación mediante el examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto (ISO 17025 apdo. 5.4.5.1)

10. BIBLIOGRAFÍA

Alfaro G, S.C; Rojas S, M.X. 2006. Validación de los métodos de filtración por membrana y sustrato definido ReadyCult, para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas crudas, tratadas y potables en el acueducto de Zipaquirá Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Microbiología Industrial, Bogotá, D.C

American public health association (APHA). 1992. american water works association (AWWA) & water environment federation (WEF): Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st Edición.

Cabrera P, C. 2015. Validación de método microbiológico cilindro en placa para determinación de la potencia de neomicina en producto farmacéutico triconjugado (neomicina, clotrimazol y betametasona), Universidad Católica de Manizales Centro de Investigación, Proyección y desarrollo, Instituto de Investigación en Microbiología Y Biotecnología Agroindustrial especialización en microbiología industrial, Manizales

Carrillo Z, E.M; Lozano C, A. M. 2008; Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar chromocult. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá D.C.

Cortes, Alejandra. 2002. Validación de la prueba de esterilidad para vacunas virales preparadas en vehículos oleoso y acuoso. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad

ENAC. 2002. Guía Para la Acreditación de Laboratorios Que Realizan Análisis Microbiológicos, (Adaptación norma ISO/IEC 17025. Traducción del documento EA

ENAC, 2011. Guía para la Acreditación de Laboratorios que realizan Análisis Microbiológicos. G-ENAC-04 Rev.56 Noviembre 2011. 9 páginas.

Gamazo .C, López-G.I, Díaz. R. 2005. Manual Práctico de Microbiología. Editorial Elsevier. España.

GARCÍA C. Revisión y actualización de los procedimientos documentados del Laboratorio de microbiología de alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana y elaboración de manual de manejo de equipos. Trabajo de grado (Microbióloga Industrial) Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C. 2006.

GTC 84, Calidad del Agua, Guía para La Orientación Acerca de La Validación de Métodos de Análisis Microbiológicos, Febrero de 2003, pág. 6.

HACH, 2000. Manual de Análisis de Agua. Edición segunda. HACH COMPANY. Loveland, Colorado; EE.UU. 217 páginas.

HAYES, 1993. Microbiología e Higiene de los Alimentos. ACRIBIA. Zaragoza España.

ISO 9000. 2000. Sistemas de Gestión de La Calidad, Fundamentos y Vocabulario, pág. 17

McFarland J, 1907. Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Jama* 14:1176-1178

Menéndez L. Alejandra, 2013; Validación y cálculo de incertidumbre para la determinación de microorganismos indicadores, mediante microbiología clásica y NPM automatizado, matrices cárnicas. Master en medioambiente y la salud. Instituto Universitario de biotecnología de Asturias. Universidad de Oviedo.

Ministerio de la Protección Social. 2007 Decreto 1575. Por medio del cual se establece el sistema de la protección y control de la calidad del agua para consumo humano.

Ministerio de la Protección Social. 1991. Resolución 12186. Por la cual se fijan las condiciones para los procesos de obtención, envasado y comercialización de agua potable tratada con destino al consumo humano.

MOSSEL A. 2003. Microbiología de los Alimentos: Fundamentos Ecológicos Para arantizar y Comprobar la Inocuidad y Calidad Microbiológica de los Alimentos, 2ª Ed., Zaragoza, Editorial Acribia, 724 p. ISBN: 84-200-0998-9

NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 4092 Reglas generales para análisis microbiológico

NTC ISO /IEC 17025; 2005. Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayo y calibración

Ocasio, N; López, M. 2004. El uso del Cloro en la Desinfección del Agua. <http://www.edustatipr.com/proyectos/inv97-98-11-3.pdf>

Ordoñez P. María A, Rojas S. Diana M., 2007; Diseño y elaboración de una guía preliminar para la validación de métodos microbiológicos estándar. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá, D. C.

Ortega G. Meylín; Rodríguez M. Claudio; Zhurbenko Raisa, 2010; Validation of alternative methods for microbiological analysis of foods and water. Qualitative methods, La Habana, Cuba

Ortiz G. Diana S. 2008, Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado elaborado en una industria farmacéutica, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad DE Ciencias Carrera de Microbiología Industrial Bogota D.C.

Ospino G. 2013. Filtración por membrana para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas. Pamplona.

Otálora Andrés. Ortiz, J. Peñaranda S, Palma R, Puentes W. Murillo C. Peralta A., Tovar G., Junio, 2005. Séptimo curso – taller VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. Laboratorio Salud Ambiental. Programa de vigilancia de la calidad del agua potable, metales y no metales de interés en Salud Publica. Bogotá, D.C.

Padilla G. José E. 2007. Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de *Bacillus cereus* Y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, carrera de Microbiología industrial, Bogotá D.C.

Páez S. Lilian J., 2008, Validación secundaria del método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de aguas para consumo humano analizadas en el laboratorio de salud pública del Huila, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.

RESOLUCIÓN 2115. 2007. Ministerio de la protección social ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial.

Rice. Eugene W. Baird Rodger B. Eaton Andrew D. Clesceri Lenore S. 2012. Standard methods for the examination of wáter and wasterwater. 22ND edition. American public health association. Washington.

Sharlab Chemie S.A. 2016, Filtración, Biolaboratorio para requerimientos microbiológicos. España.

Shekhar N.C; Singh C.P Y Laxman N.Y. 2007. Medicinal smoke reduces airborne bacteria. Journal of Ethnopharmacology, 3, 446-451.

Soler J. 2006. Validación secundaria del método de número más probable y recuento en placa profunda para coliformes totales y fecales en muestra de alimentos basadas en la norma ISO NTC 17025.

Useche Blanca, 2003. Herramientas estadísticas. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM). Ministerios de Medio Ambiente. SINA. USP. United States Pharmacopeia XXVI.

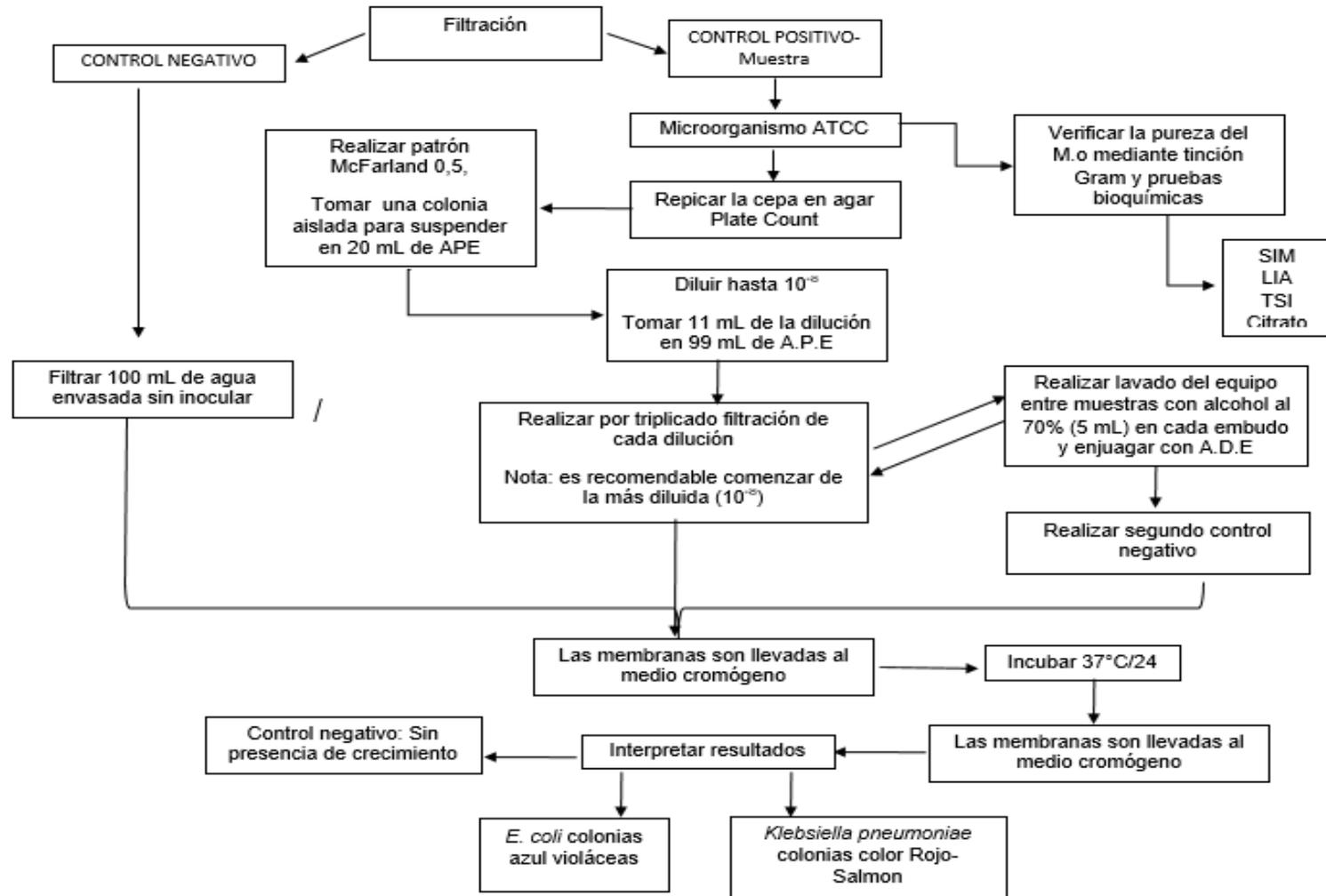
Tillett, H. E. and Lightfoot, NF. 1995. quality control in environmental microbiology compared with chemistry: What is homogeneous and what is random water sci technol, 13 pp. 471-477

Tortora G. 2007. Introducción A la Microbiología, 9ª Ed., Buenos Aires: Médica Panamericana S.A, 988 p, ISBN: 978-950-06-0740-7

United Status Phamacopeia, USP 31. 2008, Tillet HE, Lightfoot NF. Quality control in environmental microbiology compared with chemistry: What is homogeneous and what is random Water Sci Technol 2008-2009. 31:471-7. Secund edition.

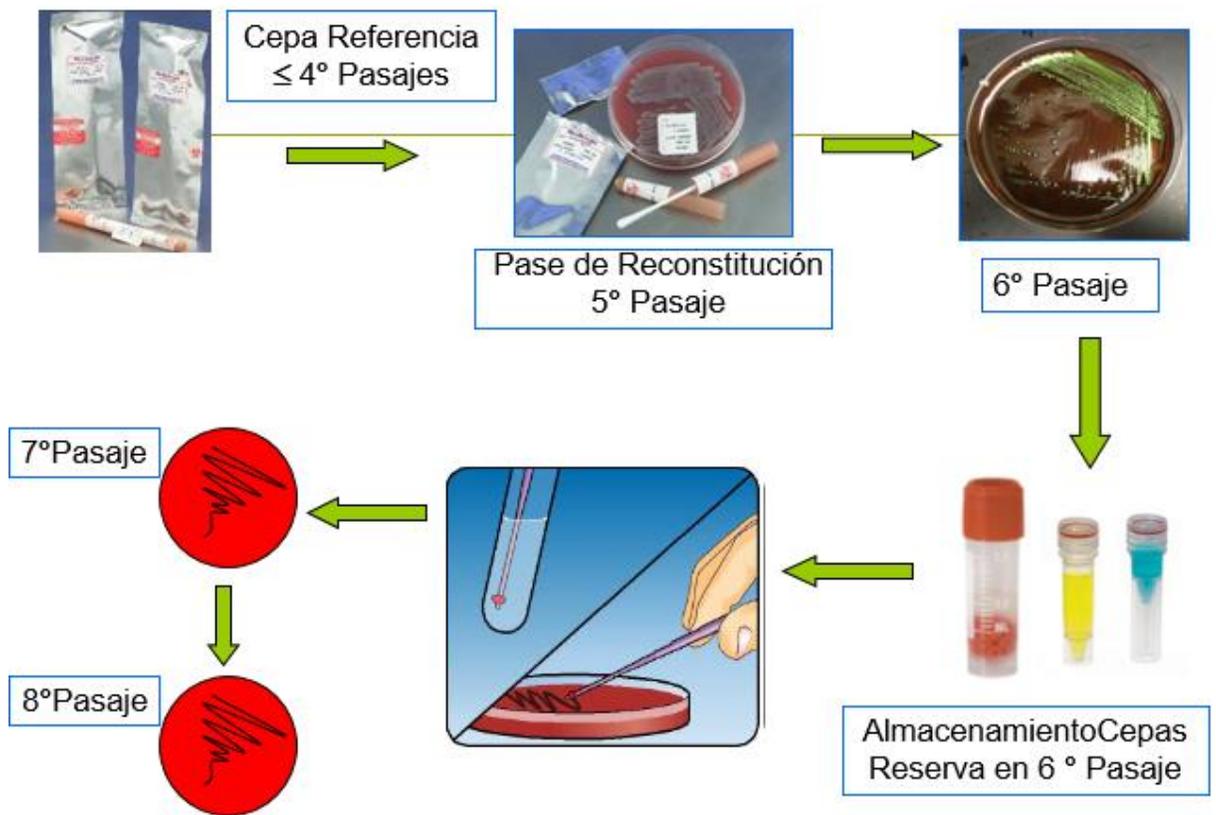
Water Quality. Enumeration of micro-organism in water samples.Guidance on the estimation of variations of results with particular reference to the contribution of uncertainty of measurement. London: British Standard Institution; 2003

Anexos 5. Estandarización inóculos de trabajo para filtración por membrana.

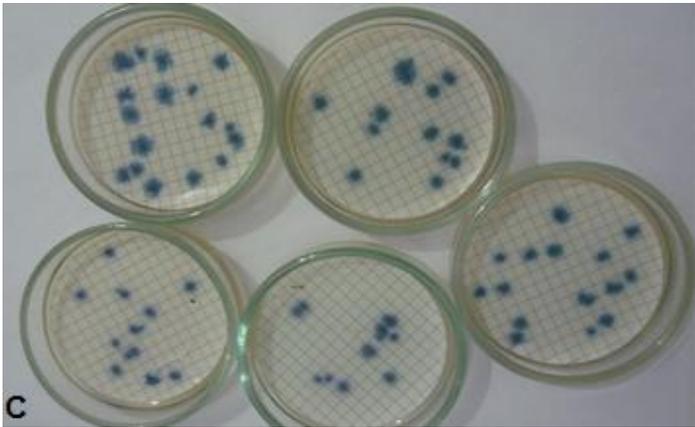
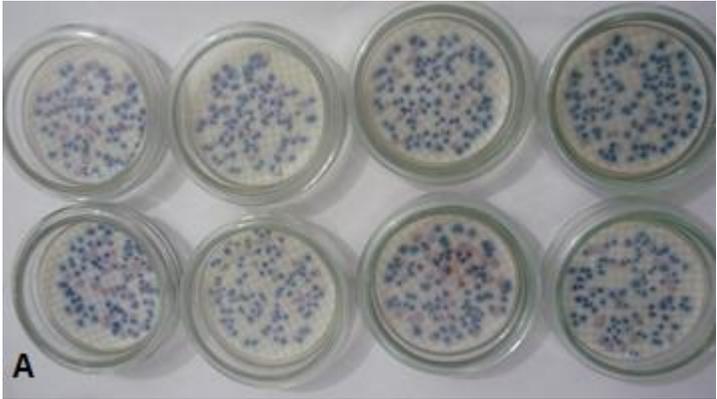


Fuente: Autor

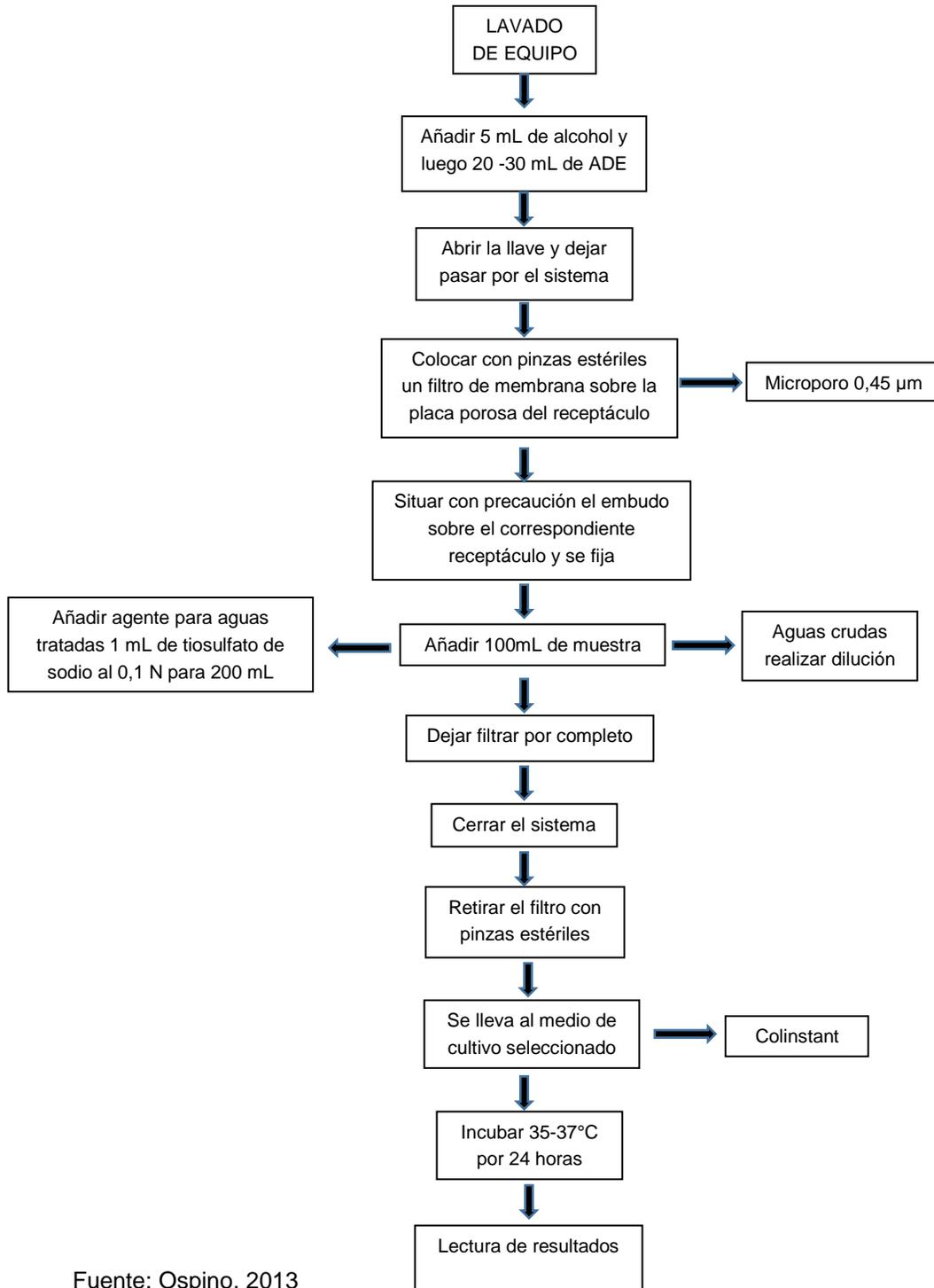
Anexos 6. Reactivación de cepas de referencia.



Anexos 7. Filtración por membrana de aguas para consumo humano, A. pool, B. *K. pneumoniae* 4352 y C. *E. coli* 25922 en agar colinstant



Anexos 10. Estandarización técnica filtración por membrana. (Standard Methods numeral 9222) (Rice et al., 2012).



Fuente: Ospino, 2013