

VALIDACIÓN SECUNDARIA DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE  
COLIFORMES POR RECUENTO EN PLACA EN DOS MEDIOS DE CULTIVO  
COMERCIALES, EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE  
PASTEURIZADORA SANTO DOMINGO S.A.

YBELDA ROCIO BLANCO CASTIBLANCO

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
PAMPLONA – NORTE DE SANTANDER  
2017

VALIDACIÓN SECUNDARIA DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE  
COLIFORMES POR RECUENTO EN PLACA EN DOS MEDIOS DE CULTIVO  
COMERCIALES, EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE  
PASTEURIZADORA SANTO DOMINGO S.A.

YBELDA ROCIO BLANCO CASTIBLANCO  
TRABAJO DE PRÁCTICA EMPRESARIAL PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
MICROBIÓLOGO

ASESOR:

DANNY ARMANDO PISCIOTTI

Microbiólogo

ASESORES EXTERNOS:

HÉCTOR EDUARDO SANCHEZ

Químico de Alimentos

MAYERLI CANO BALLESTEROS

Microbióloga Industrial

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
PAMPLONA – NORTE DE SANTANDER  
2017

Nota de aceptación

---

---

---

---

Firma Del Jurado

---

Firma Del Jurado

Pamplona, 13 de junio del 2017

## DEDICATORIA

Quiero dedicar este gran paso en mi vida a Dios por llenarme de fortaleza, llevarme siempre por el camino correcto , a mis padres Guillermo Blanco Espinosa y Gloria Castiblanco Gómez por ser el pilar de apoyo ante tantos altibajos, a mis hermanos ( Luis Alfredo y Alex) por creer y confiar en mí.

"No temas, porque yo estoy contigo; no desmayes, porque yo soy tu Dios que te esfuerzo; siempre te ayudaré, siempre te sustentaré con la diestra de mi justicia." Isaías 41:10

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios por permitirme conocer parte de un mundo desconocido de la microbiología.*

*Gracias a mis padres y hermanos por apoyarme y animarme que este sueño fuese posible, por creer en mí ante tantas dificultades.*

*Gracias al equipo de Pasteurizadora Santo Domingo S.A. por brindarme la oportunidad de realizar mi práctica empresarial en su Laboratorio.*

*Al personal docente de la Universidad de Pamplona que me acompañaron, apoyaron y creyeron en mí, por guiarme, asesorarme y tenerme paciencia a lo largo de mi trabajo de grado.*

*Gracias a mi compañera incondicional Leydis Vides Castro que estuvo ahí en momentos que quise desfallecer.*

## CONTENIDO

	PÁG.
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>1 OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>12</b>
<b>2 JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>3 MARCO REFERENCIAL</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1 MARCO LEGAL</b> .....	<b>14</b>
3.1.1 NTC-ISO/IEC Colombiana 17025 2005.....	14
3.1.2 GUIA TECNICA COLOMBIANA GTC 78. 2002.....	14
3.1.3 NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC ISO 11133. 2014 .....	14
3.1.4 AOAC oficial method 991.14 coliform and <i>Escherichia coli</i> counts in foods.....	14
3.1.5 NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA 4458 .....	14
3.1.6 NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA 4092 .....	14
<b>3.2 ANTECEDENTES</b> .....	<b>15</b>
<b>3.3 MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
3.3.1 VALIDACIÓN .....	16
3.3.2 MODALIDADES O TIPOS DE VALIDACION .....	17
3.3.3 TIPOS DE MÉTODOS .....	18
3.3.4 TIPOS DE VALIDACIÓN.....	18
3.3.5 PARÁMETROS ESPECÍFICOS DEL PROCESO DE VALIDACIÓN..	19
3.3.6 CARACTERÍSTICAS DE CEPAS.....	22
3.3.7 MEDIOS DE CULTIVO.....	23
<b>4 METODOLOGÍA</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS</b> .....	<b>27</b>
4.1.1 REACTIVOS .....	27
4.1.2 MEDIOS DE CULTIVO.....	27
4.1.3 MATERIAL .....	27
4.1.4 EQUIPOS.....	27
4.1.5 CEPAS .....	27
<b>4.2 ALCANCE DEL ESTUDIO</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3 METODOS PARA GARANTIZAR LA ASEPSIA DEL AREA DE TRABAJO</b> .....	<b>28</b>
4.3.1 Luz ultravioleta .....	28

4.3.2	Métodos químicos .....	28
4.3.3	Control de ambientes e interferencias.....	28
4.3.4	Equipo instrumental de laboratorio.....	29
4.3.5	Control de crecimiento de microorganismos. ....	29
4.3.6	Control de calidad de los medios de cultivo .....	29
<b>4.4</b>	<b>ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL LABORATORIO DE PASTERIZADORA SANTO DOMINGO. S.A.....</b>	<b>30</b>
<b>4.5</b>	<b>PROTOCOLO PARA TEST DE PRODUCTIVIDAD Y SELECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO .....</b>	<b>32</b>
4.5.1	Método Ecométrico De Control De Medio De Cultivo VRBL .....	32
<b>4.6</b>	<b>PROTOCOLO PARA LA VALIDACIÓN SECUNDARIA DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE COLIFORMES POR RECUENTO EN PLACA DE MEDIOS DE CULTIVO EMPLEANDO UNA MATRIZ LÍQUIDA .....</b>	<b>33</b>
4.6.1	Preparación Del Inóculo Estándar De Trabajo .....	33
4.6.2	Verificación De la productividad del Medio De Cultivo Por Recuento En Placa .....	34
4.6.3	Validación secundaria del método de determinación de coliformes por recuento en placa.....	34
<b>5</b>	<b>CONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS Y ANÁLISIS.....</b>	<b>37</b>
6.1	VERIFICACIÓN DE ESTERILIZACIÓN DE AUTOCLAVES.....	37
6.2	CONTROL DE ESTERILIDAD DE MEDIOS DE CULTIVOS.....	37
6.3	CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE REFERENCIA .....	38
6.4	RESULTADOS TEST ECOMÉTRICO.....	41
<b>6.5</b>	<b>RESULTADOS DE VALIDACION DE LA METODOLOGÍA DE DETERMINACION DE COLIFORMES POR RECUENTO EN PLACA.....</b>	<b>43</b>
6.5.1	Validación primaria.....	44
6.5.2	Validación del método en matriz de agua peptonada.....	45
6.5.3	Validación secundaria .....	49
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>GLOSARIO .....</b>	<b>55</b>
<b>10</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>57</b>
<b>11</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	PÁG.
<b>Tabla 1.</b> Interpretación del Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) para microorganismo interferente .....	24
<b>Tabla 2.</b> Interpretación del Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) para microorganismos referentes o de interés .....	25
<b>Tabla 3.</b> Criterio de evaluación .....	25
<b>Tabla 4.</b> Propiedades indicadoras de promoción del crecimiento e inhibitorias del medio selectivo y diferencial sólidos. ....	25
<b>Tabla 5.</b> Parámetros microbiológicos realizados en el laboratorio.....	30
<b>Tabla 6.</b> Pruebas confirmativas de cepas de referencia.....	38
<b>Tabla 7.</b> Características macroscópicas de las cepas de trabajo en medio VRBL. ....	40
<b>Tabla 8.</b> Test ecométrico cepa referente <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	42
<b>Tabla 9.</b> Test ecométrico cepa interferente <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538..	42
<b>Tabla 10.</b> pH de los medios de cultivo empleados. ....	43
<b>Tabla 11.</b> Escala McFarland. Esta tabla permite observar las concentraciones de la escala con sus correspondientes valores esperados a determinada dilución. ....	43
<b>Tabla 12.</b> Información del método validado.....	44
<b>Tabla 13.</b> Ensayo número 1 para la estandarización de la matriz agua peptonada.....	45
<b>Tabla 14.</b> Ensayo número 2 para la estandarización de la matriz agua peptonada.....	45
<b>Tabla 15.</b> Ensayo número 3 para la estandarización de la matriz agua peptonada.....	46
<b>Tabla 16.</b> Ensayo número 4 para la estandarización de la matriz agua peptonada.....	46
<b>Tabla 17.</b> Ensayo número 5 para la estandarización de la matriz agua peptonada.....	46
<b>Tabla 18.</b> Estadística de repetitividad en matriz de agua peptonada. ....	47
<b>Tabla 19.</b> Estadística de reproducibilidad en matriz de agua peptonada. ....	48
<b>Tabla 20.</b> Ensayo número 1 Matriz derivado lácteo.....	49
<b>Tabla 21.</b> Ensayo número 2 Matriz derivado lácteo.....	49
<b>Tabla 22.</b> Ensayo número 3 Matriz derivado lácteo.....	50
<b>Tabla 23.</b> Estadística de repetitividad en matriz del derivado lácteo. ....	50
<b>Tabla 24.</b> Estadística de reproducibilidad en matriz del derivado lácteo. ....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>PAG.</b>
<b>Figura 1.</b> Método ecométrico empleado para pruebas de eficacia del medio de cultivo.....	32
<b>Figura 2.</b> Esquema de la metodología de recuento en placa. ....	34
<b>Figura 3.</b> Control de ambientes en cabina de flujo laminar. ....	37
<b>Figura 4.</b> Tinción de Gram <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 100 X.....	38
<b>Figura 5.</b> Tinción de Gram <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538. 100x. ....	39
<b>Figura 6.</b> Activación de la cepa. ....	39
<b>Figura 7.</b> Prueba de Catalasa y oxidasa para <i>S. aureus</i> ATCC 6538 (autor).....	40
<b>Figura 8.</b> Prueba de catalasa y oxidasa para <i>E. coli</i> ATCC 8739 (autor) .....	40
<b>Figura 9.</b> Test ecométrico realizado. ....	41

## INTRODUCCIÓN

En gran parte de la industria alimentaria, los laboratorios de control calidad juegan un papel importante, debido a que son los encargados de definir los criterios de aceptabilidad o rechazo de un producto basados en el cumplimiento de la normatividad, y por tanto deben garantizar la precisión y exactitud de los ensayos realizados por medio de la aplicación de un sistema de gestión de calidad basado en la norma NTC ISO/IEC 17025 la cual exige la validación de metodologías, calibración de equipos y la idoneidad del personal siendo aplicable a todos y permitan que sean competentes y pueden generar resultados válidos.

Un punto crítico a tener en cuenta en el sistema de calidad, para implementar esta norma y acreditar el laboratorio es el procedimiento de la preparación, esterilización y evaluación de la calidad de los medios de cultivo, necesario para mantener el nivel y la aplicación de cualquier técnica microbiológica.

Como consecuencia se ha visto la necesidad de crear laboratorios de análisis para alimentos que lleven a cabo ensayos para determinar la calidad de los productos en las empresas que los elaboran. Su objetivo principal es reportar resultados altamente confiables, por tal razón deben controlar y asegurar la calidad.

La validación de una técnica es el procedimiento mediante el cual se realizan análisis de laboratorio evaluando el desempeño de un método, determinando las variaciones entre ensayos con el fin de disminuir el porcentaje de error, generando confiabilidad en los análisis realizados. Además de la validación de procedimientos técnicos debe incluir manuales de procedimientos que garanticen que se lleven a cabo de manera indicada, lo cual se verifica mediante la validación de las técnicas más utilizadas en el laboratorio; lo que implica obtener evidencia documentada que permita confirmar que los resultados obtenidos son confiables y reproducibles. También garantiza que los resultados de los análisis ejecutados en un laboratorio cumplan con los requisitos de calidad basados en las normas. En este ensayo se analizarán metodologías basadas en las normas técnicas colombianas NTC 4092 y la NTC 4458.

Para la validación de una metodología que se implementa en un laboratorio de microbiología se deben tener en cuenta los medios de cultivo y su capacidad de recuperar la carga bacteriana presente en la matriz analizar, además de tener en cuenta el funcionamiento adecuado de los equipos a utilizar, para esto se revisaron registros de temperaturas y tener un conocimiento claro de las técnicas que se utilizan a diario.

El laboratorio de pasteurizadora Santo Domingo S.A. validó la metodología empleada para la determinación de Coliformes en medios de cultivo sólidos (medio de cultivo VRB Agar Bilis Rojo Violeta). Centrándose en una validación secundaria la cual tiene lugar cuando el laboratorio procede a implementar un método desarrollado, es decir ya está establecido.

Se tuvo en cuenta todos estos parámetros lo cual permitió demostrar que los resultados del laboratorio son confiables y reproducibles.

# 1 OBJETIVOS

## 1.1 OBJETIVO GENERAL

Validar la metodología empleada para la determinación de Coliformes en medios de cultivo sólidos, en el laboratorio de Pasteurizadora Santo Domingo S.A.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Asegurar la calidad y desempeño de los medios de cultivos mediante la aplicación de cepas de referencia, estableciendo la productividad y selectividad de los mismos por medio de la cuantificación de cepas referentes e interferentes.
- Establecer parámetros para la determinación de coliformes en matriz líquida (derivado lácteo) en el laboratorio de Pasteurizadora Santo Domingo S.A. a partir de un análisis estadístico.

## 2 JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a la exigencia del ente regulador INVIMA según la resolución 1619 del 15 de mayo de 2015 con respecto a la aplicación de los estándares de calidad al laboratorio de Pasteurizadora Santo Domingo, se vio la necesidad de realizar la validación de una metodología microbiológica y a la implementación de uso de cepas de referencia.

Por tal razón se realizó una validación secundaria del método de determinación de coliformes por recuento en placa teniendo en cuenta la verificación del medio de cultivo VRB, con el fin de establecer el cumplimiento de las especificaciones establecidas según las normas técnicas Colombianas NTC 4092 y NTC 4458.

El proceso de validación de la metodología en el laboratorio permite la obtención de evidencias que prueban que el método cumple las funciones para el cual fue estipulado. En este caso se demostrará que la metodología utilizada para la determinación de los coliformes totales desarrollada por el laboratorio se realiza de manera adecuada lo que garantiza los resultados.

Para este estudio se debe tener en cuenta la evaluación de los medios de cultivo que se va utilizar para la recuperación y proliferación del microorganismo que se desee.

### 3 MARCO REFERENCIAL

#### 3.1 MARCO LEGAL

##### 3.1.1 NTC-ISO/IEC Colombiana 17025 2005.

Esta Norma Internacional establece los requisitos y parámetros 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*).

##### 3.1.2 GUIA TECNICA COLOMBIANA GTC 78. 2002

Norma técnica colombiana que proporciona la terminología general que indica los parámetros para el aseguramiento de la calidad en la preparación de medios de cultivo, y especifica los requisitos mínimos para un análisis microbiológico de productos destinados al consumo humano o de alimento para animales.

##### 3.1.3 NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC ISO 11133. 2014

Establece los criterios y describe los métodos para las pruebas de rendimiento de los medios de cultivo.

##### 3.1.4 AOAC oficial method 991.14 coliform and *Escherichia coli* counts in foods.

Esta Norma Internacional da directrices generales para la enumeración de coliformes. Es aplicable a los productos destinados al consumo humano.

##### 3.1.5 NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA 4458

Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos.

##### 3.1.6 NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA 4092

Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos.

### 3.2 ANTECEDENTES

Teniendo en cuenta las normas nacionales e internacionales se ha convertido un ítem primordial la validación de métodos microbiológicos para los análisis de laboratorio de tal manera que ha pasado a ser obligatoria para estos.

En el país se ha trabajado en la validación del método para determinación de coliformes totales por recuento en placa, sujetas a la ISO17025 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.

Revisando en literatura se pueden encontrar estudios basados en los parámetros que se deben cumplir para la realización de validación de metodologías en laboratorios, como se puede ver plasmado en un estudio realizado en Madrid en el año 2005 en el cual se estudia detalladamente las directrices y conceptos generales que se debe tener en cuenta al realizar una validación de una metodología. (Sánchez 2005).

Las metodologías más usadas para detección de coliformes mas encontradas es NMP, filtración por membrana usando medios de cultivo como Colinstant y Chromocult están ampliamente referenciadas por diversos autores. Sin embargo no se han hallado trabajos específicos y recientes donde se valide el método de recuento en placa exclusivamente con medio de cultivo VRB, por lo tanto este estudio se basó de un método normalizado para ser usado en el laboratorio de Microbiología.

Con respecto a la validación de la metodologías por recuento en placa se revisó un estudio de Padilla 2007, en el cual se realizó una 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. La metodología ejecutada permitió evaluar la reproducibilidad y repetitividad de la validación secundaria concurrente del método de recuento en placa que arrojó coeficientes de variación con altos grados de concordancia para los diferentes ensayos realizados.

Otro estudio por Sánchez 2005, plantea la situación de la validación de los ensayos microbiológicos en los laboratorios, aquí se encuentran parámetros primordiales para estos ensayos.

### 3.3 MARCO TEÓRICO

#### 3.3.1 VALIDACIÓN

El desarrollo y realización de análisis de control microbiológico es una herramienta que tiene una repercusión decisiva en la tecnología e industria alimentaria y del medio ambiente. En los últimos años las actividades relacionadas con la verificación y validación de métodos analíticos han cobrado gran importancia debido a que por un lado se presenta un continuo desarrollo y actualización de técnicas y equipos analíticos y por otro lado existe un creciente interés de los profesionales en garantizar la calidad de sus procesos y resultados.

La validación puede definirse como el conjunto de procesos desarrollados para la «confirmación mediante examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto de los procedimientos analíticos. (*Camaró et al 2013*)

Es la confirmación mediante el suministro de una evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación específica prevista. La validación examina las características de desempeño de un método para identificar y establecer cualquier limitación que pueda esperarse del método, así como identificar los factores que pueden influir en el cambio de dichos parámetros y limitaciones; permite demostrar que el método es adecuado para el propósito. (*Cañes. et al. 2015*).

Validar un método consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos, previamente establecidos por el usuario para poder resolver un problema analítico particular. Es un proceso mediante el cual se establece por medio de estudios de laboratorio que las características representativas del método analítico cumplen con las especificaciones para su aplicación.

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 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 (*Soledad 2009*). Incluso cuando se haya realizado la validación, 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 (Soledad, 2009).

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).

### **3.3.2 MODALIDADES O TIPOS DE VALIDACION**

#### **3.3.2.1 Validación primaria.**

La validación primaria es un proceso exploratorio que tiene como meta 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. La validación primaria va precedida de la elaboración de un esquema de ensayo especialmente diseñado. Corresponde con la validación inicial que deben llevar a cabo los laboratorios y casas comerciales que diseñan un equipo diagnóstico, una prueba nueva o la unión en un solo protocolo de varios métodos normalizados o no. También corresponde con la caracterización que debe realizarse a una técnica que se desarrolla en un laboratorio para su propio uso.

#### **3.3.2.2 Validación secundaria.**

La validación secundaria se realiza cuando un laboratorio procede a implementar un método desarrollado en otra parte. Se centra en la reunión de evidencias acerca de que el laboratorio está capacitado para cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria. Algunos organismos lo denominan verificación y es la confirmación, mediante el aporte de pruebas objetivas, de que se cumplen los requisitos establecidos en las condiciones de uso de ese laboratorio. Se trata de la validación que hay que llevar a cabo cuando se introduce un equipo diagnóstico, método o prueba en un laboratorio clínico y que ya está validada primariamente por organizaciones internacionales. Normalmente la validación secundaria emplea formas seleccionadas y simplificadas de los procedimientos empleados en la validación primaria, aunque posiblemente extendidas por un tiempo mayor. Las características incluyen: precisión, exactitud, sensibilidad, especificidad y rango de resultados, límite de detección y/o cuantificación y cuando sea apropiado, valor predictivo.

La validación secundaria se realiza cuando un laboratorio procede a implementar un método desarrollado en otra parte. Se centra en la reunión de evidencias acerca de que el laboratorio está capacitado para cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria. Algunos organismos le denominan verificación y es la confirmación, mediante el aporte de pruebas objetivas, de que se cumplen los requisitos establecidos en las condiciones de uso de ese laboratorio. Se trata de la validación que hay que llevar a cabo cuando se introduce un equipo diagnóstico, método o prueba en un laboratorio y que ya está validada primariamente por organizaciones internacionales. (*Camaró, et al 2013*)

Para un laboratorio de análisis es importante validar sus técnicas, para así optimizar sus procesos, lo cual le beneficia debido a que reduce 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 que rigen el 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*).

### **3.3.3 TIPOS DE MÉTODOS**

#### **3.3.3.1 Métodos Normalizados**

Es un método analítico desarrollado por un organismo de normalización u otro organismo reconocido cuyos métodos son aceptados por el sector técnico correspondiente.

#### **3.3.3.2 Métodos No Normalizados**

Método analítico desarrollado por un tercero o que ha sido adaptado por el laboratorio a partir de un método normalizado. En esta se cabe resaltar que el desarrollo del método, así como su adaptación, incluye la etapa de validación.

### **3.3.4 TIPOS DE VALIDACIÓN**

#### **3.3.4.1 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*).

#### **3.3.4.2 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*).

#### **3.3.4.3 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*).

### **3.3.5 PARÁMETROS ESPECÍFICOS 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*).

#### **3.3.5.1 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 normatividad internacional (*Ospino, 2013*).

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

#### **3.3.5.2 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*).

#### **3.3.5.3 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*).

#### **3.3.5.4 Selectividad**

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

#### **3.3.5.5 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)

#### **3.3.5.6 Linealidad**

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.

#### **3.3.5.7 Repetibilidad**

El grado de concordancia entre los resultados independientes obtenidos con el mismo método material de ensayo, en las mismas condiciones (mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y después de breves intervalos de tiempo). En

algunos contextos repetibilidad se puede definir como el valor por debajo del cual se encuentra la diferencia absoluta entre dos resultados individuales obtenidos en las condiciones anteriores, con una probabilidad especificada. (Sánchez L y col 2011.)

### **3.3.5.8 Reproducibilidad**

El grado de concordancia entre los resultados independientes obtenidos con el mismo método material de ensayo, pero en condiciones diferentes (operadores diferentes, aparatos diferentes, diferentes laboratorios y / o después de diferentes intervalos de tiempo. En algunos contextos reproducibilidad se puede definir como el valor por debajo del cual está la diferencia absoluta entre dos resultados individuales obtenidos con material idéntico en las condiciones anteriores, con una probabilidad especificada. Se debe tener en cuenta que una declaración completa de la reproducibilidad requiere la especificación de las condiciones experimentales que se modifican. (Sánchez y col 2011.)

### **3.3.5.9 Análisis estadísticos.**

Se determinan las desviaciones estándar (DS) tanto para las pruebas realizadas en la estandarización del inóculo, de tal manera que con este valor se hallan los coeficientes de variación (CV), los cuales son necesarios para determinar los dos parámetros de calidad para la validación de métodos (repetitividad y reproducibilidad). Para el cálculo de este coeficiente de variación es necesario hallar la media de los datos ( $X$ ), cada uno de estos análisis estadísticos es 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

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

*Donde:*

$DS$ : Desviación estándar

$x$ : Dato o valor experimental

$X$ : Promedio de los datos

*n*: Número de datos.

Esta nos permitió saber cuánto pueden estar alejados los datos con respecto a la media

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

Donde:

*CV*: Coeficiente de Variación

*DS*: Desviación estándar

*X*: Promedio de los datos

El coeficiente de variación se suele expresar en porcentajes y permite comparar las dispersiones de dos distribuciones distintas, siempre que sus medias sean positivas.

### **3.3.6 CARACTERÍSTICAS DE CEPAS**

#### **3.3.6.1 CARACTERIZACIÓN DE *Staphylococcus aureus*.**

El género *Staphylococcus* spp está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 µm, agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* spp los géneros *Streptococcus* spp y *Enterococcus* spp que son catalasa negativos.

*S. aureus* es la principal especie causante de intoxicaciones estafilocócicas causadas por el consumo de alimentos contaminados; *S. aureus* es capaz de producir una gran variedad de enterotoxinas, sin embargo el 95% de los casos de intoxicaciones han sido producidas por las enterotoxinas clásicas A, B, C, D y E (Zendejas. Et al 2014).

Se inactiva a temperaturas de cocción (> 65°C). *S. aureus* coagulasa positiva presenta un *D*<sub>60</sub> entre 0,43 y 8,0 minutos pero depende del tipo de carne (Fuentes y Moreno. 2011).

### **3.3.6.2 COLIFORMES**

Bacterias Gram negativas de forma bacilar que fermentan la lactosa a temperatura de 35 a 37°C, produciendo ácido y gas (CO<sub>2</sub>) en un plazo de 24 a 48 horas. Se clasifican como aerobias o anaerobias facultativas, son oxidasa negativa, no forman esporas y presentan actividad enzimática de la galactosidasa. Es un indicador de contaminación microbiológica en alimentos. (*Resolución 2115, 2007*).

Pueden encontrarse en la flora normal del tracto digestivo del hombre o animales, por lo cual son expulsados especialmente en las heces son el grupo más ampliamente utilizado en la microbiología de alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas.

También son evaluados en la calidad microbiológica de un producto, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario, cuando los coliformes son de origen no-fecal. (*Camacho, 2009*)

#### **3.3.6.2.1 *Escherichia coli***

Bacilo Gram negativo que forma parte de la flora normal de intestino de animales de sangre caliente. Es aerobio facultativo, de metabolismo fermentativo. Algunas cepas pueden producir enterotoxinas y tiene otros factores de virulencia de colonización e invasión por lo cual pueden causar enfermedades diarreicas, urinarias y nosocomiales. (*NTC 4458*).

### **3.3.7 MEDIOS DE CULTIVO**

Los medios de cultivo son considerados uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos en ellos se puede detallar su crecimiento basado en sustancias químicas artificiales preparadas en el laboratorio.

Para que los microorganismos crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como lo son temperatura, grado de humedad, y presión de oxígeno adecuado, así como lo es la acidez o alcalinidad. Debe contener nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar libre de todo microorganismo contaminante.

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos. El agar es un elemento empleado para la preparación de medios de cultivo.

Contienen hidratos de carbono por motivos fundamentales como incrementar el valor nutritivo de medio de cultivo, también contienen indicadores de pH los cuales permiten ver su alcalinidad o su acidez (*Casado, et al., 2012*).

### 3.3.7.1 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).

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 1.** Interpretación del Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) para microorganismo interferente

<b>Medio de cultivo analizar</b>	<b>Interpretación</b>	<b>ICA</b>
	medios altamente selectivos	0
	medios medianamente selectivos	0-2,5
	medios no selectivos	>2,5

**Tabla 2.** Interpretación del Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) para microorganismos referentes o de interés

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

(Tortora et.al, 2007).

**Tabla 3.** Criterio de evaluación

PRODUCTIVIDAD	SELECTIVIDAD
Para todas las cepas en un medio de cultivo no selectivo, el ICA debe ser por lo menos 3,5.	Para las cepas no deseadas en los medios selectivos, el ICA no debe ser mayor de 2, y para la cepa deseada no debe ser menor de 3.

(Tortora. et.al, 2007).

### 3.3.7.2 PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS

Se debe analizar cada partida de medio preparado a partir de medio deshidratado. Verificar las propiedades adecuadas del medio pertinentes.

**Tabla 4.** Propiedades indicadoras de promoción del crecimiento e inhibitorias del medio selectivo y diferencial sólidos.

MEDIO DE PRUEBA	PROPIEDAD	CEPA DE PRUEBA	CONDICIONES DE INCUBACION
Agar Violeta Rojo Bilis	Promoción del crecimiento +indicadora	<i>E. coli</i>	35-37°C 30-35°C/18-24h

El test ecométrico se realizara para la verificación del medio de cultivo, los ensayos para la validación de la metodología de determinación de coliformes se ha realizado cinco veces posteriormente a esto se realizara análisis de datos con exactitud, precisión, robustez, límite de detección, repetitividad y reproducibilidad.

#### **3.3.7.3 PRUEBA DE LAS PROPIEDADES DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO, MEDIOS SÓLIDOS**

Usar el método de extensión en superficie inoculando cada una de las placas con un número no mayor de 100 UFC del microorganismo especificado (microorganismo de referencia). Incubar a temperatura y tiempo según el microorganismo. Se produce un crecimiento de microorganismos comparable al obtenido anteriormente con una partida de medio analizada y aprobada previamente.

#### **3.3.7.4 PRUEBA DE LAS PROPIEDADES INHIBITORIAS, MEDIOS SÓLIDOS**

Inocular el medio adecuado con al menos 100 UFC del microorganismo adecuado (microorganismo interferente). Incubar a temperatura y tiempo según el microorganismo. No se produce crecimiento del microorganismo de prueba

## 4 METODOLOGÍA

### 4.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

#### 4.1.1 REACTIVOS

Colorantes de tinción de GRAM; Alcohol al 96%, agua destilada.

#### 4.1.2 MEDIOS DE CULTIVO

Peptona (Neogen); Agar VBRL (CONDA); Agar VRBL (HIMEDIA), Agar YGC (Merck), Agar plate count (Merck).

#### 4.1.3 MATERIAL

Frascos Schott por 250mL; Frascos Schott por 500mL; Micropipetas, puntas estériles, Portaobjetos; Tubos de ensayos con tapa estériles y del mismo volumen; cajas estériles de Petri; Pipeteador; Mechero; Gradillas; Asas calibradas 1µL; Asas calibradas de 10µL; Asas de hockey estériles.

#### 4.1.4 EQUIPOS

Baño serológico  $45 \pm 2$  °C, Incubadora regulada a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , Microscopio óptico, Horno esterilizador, Autoclave para material estéril, Autoclave para material contaminado, Contador de colonias, Nevera, Cabina de flujo laminar.

#### 4.1.5 CEPAS

Cepa *Escherichia coli* ATCC 8739

Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Patrón Macfarlán comercial 0.5 Concentración  $1.5 \times 10^8$  UFC mL de cada una de las cepas mencionadas.

### 4.2 ALCANCE DEL ESTUDIO

La validación secundaria del método de recuento en placa abarca el análisis de productividad y selectividad de los medios de cultivo empleados mediante un test ecométrico, y análisis de precisión (repetitividad, reproducibilidad), exactitud (porcentaje de recuperación), aplicabilidad y sensibilidad del método utilizando dos medios de cultivo y cepas de referencia para la determinación de coliformes de acuerdo a la NTC 4458.

### **4.3 METODOS PARA GARANTIZAR LA ASEPSIA DEL AREA DE TRABAJO**

#### **4.3.1 Luz ultravioleta**

Alteran el material genético de los microorganismos provocando su desaparición, se usan en pequeñas zonas por corto tiempo esta luz UV limita su uso a superficies y el aire son usados en cabinas de esterilización, en este caso en el área de lectura y repique ya que en el laboratorio se encuentran lámparas de radiación ultravioleta en todo el área para luego de que se realice la limpieza y desinfección son encendidas por un tiempo de veinte minutos antes de empezar con los análisis en el laboratorio y evitar contaminación por superficies y ambientes.

#### **4.3.2 Métodos químicos**

Son aplicados sobre superficies limpias, de acuerdo a los procedimientos establecidos en el manual de BPL, se aplicaron una serie de actividades con el fin de garantizar la higiene y asepsia del área de siembra, para lo cual diariamente se realizaba operaciones de limpieza de superficies con detergente alcalino al 3%, para pisos con jabón con compuesto alcalino clorado al 1%, para desinfección del ambiente de siembra se aplicó por aspersión productos a base de amonio cuaternario y biguanidina. Para limpieza de cabina de flujo laminar se utilizó alcohol al 96%.

Respetando el tiempo de contacto y la temperatura establecida, a dosis menores que las cantidades recomendadas aumentan la resistencia de los microorganismos y aplicados a dosis muy altas aumentan el efecto corrosivo, sin mejorar su efecto desinfectante. En el laboratorio son usados de manera rotativa, al entrar en la mañana y cuando se terminan los análisis que se realizan diariamente para optar por que el laboratorio este menos contaminado con microorganismos contaminantes de superficie y ambiente.

#### **4.3.3 Control de ambientes e interferencias**

Utilizando la técnica de sedimentación, en punto estratégico del área de trabajo en este caso la cabina de flujo laminar 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 20 minutos. Las cajas con agar Plate count se incubaron a 37°C +/- 2°C durante 24 horas, y las cajas con agar YGC se dejaron a temperatura ambiente durante 4 días. Finalizado el periodo de incubación, se realizó el recuento de microorganismos. Este procedimiento se realizó cada vez

que se procedió al ensayo para la verificación. También se utilizó este control en la cabina de flujo laminar.

Para cada ensayo con los medios de cultivo se utilizó una caja de Petri como control del medio a utilizar.

#### **4.3.4 Equipo instrumental de laboratorio**

De acuerdo a las políticas del laboratorio de Pasteurizadora Santo Domingo se llevaron a cabo las tareas de mantenimiento y calibración de los respectivos equipos, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### **4.3.5 Control de crecimiento de microorganismos.**

Fueron realizados controles positivo y negativo, luego utilizando cepas de referencia certificadas, a través de la implementación del método ecométrico y partir de inóculos estandarizados de microorganismos de interés *E. coli* ATCC 8739, microorganismo interferente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

##### **4.3.5.1 Cepas de referencia**

Se caracterizan por ser cepas liofilizadas contenidas en 2 Pack, cada pack contiene una preparación de microorganismo no enumerada o cualitativa en cuarto pase proveniente del cultivo de referencia. Las cepas seleccionadas fueron: Cepa *Escherichia coli* ATCC 8739 y Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

La reactivación de las cepas se realizó de acuerdo al procedimiento establecido por la casa comercial Microbiologics® (*Ver Anexo 3*), referencia KWIK-STICK™, luego de la reactivación se procedió a la estandarización del inóculo y se denominaron cepas de trabajo pase cinco. La activación se realizó en agar plate count en la cual se incubaron la Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 a 37°C por 48 horas por especificaciones del agar plate count, en cuanto a Cepa *Escherichia coli* ATCC 8739 se incubó a 37°C por 24 horas.

#### **4.3.6 Control de calidad de los medios de cultivo**

En el laboratorio de Pasteurizadora Santo Domingo ha considerado el control de calidad de los medios de cultivo uno de los puntos críticos de control, debido a que dependiendo de la calidad de ellos, aumenta la confiabilidad y calidad de los resultados que se le ofrecen.

Dentro del sistema de gestión de calidad del laboratorio incluye la política de la implementación de las buenas prácticas de laboratorio por medio de las cuales es necesario 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 de los medios de cultivo VRBL CONDA (Lot No.

604131) y VRBL HIMEDIA (Lot No: 0000245440) suministradas por la casa comercial.

#### 4.4 ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL LABORATORIO DE PASTERIZADORA SANTO DOMINGO. S.A.

Para llevar a cabo el análisis en el laboratorio de muestras se tiene en cuenta parámetros evaluados por el INVIMA para alimentos listos para consumo humano; también se realizan análisis de las materias primas de manera que se pueda garantizar la trazabilidad, estos varían de acuerdo al tipo de producto (Lácteos UHT, saborizadas, bebidas lácteas fermentadas, refrescos, gelatinas, materias primas entre otros), varían dependiendo del alimento y de la solicitud del cliente

**Tabla 5.** Parámetros microbiológicos realizados en el laboratorio.

<b>Muestra</b>	<b>Análisis</b>	<b>Metodología</b>
Yogurt, bebidas lácteas fermentadas, kumis semidescremado. Kumis entero.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coliformes totales, fecales (Medio de cultivo VRBL )</li> <li>• Mohos y Levaduras. (Medio de cultivo YGC y petrifilm )</li> </ul>	Recuento en placa por profundidad o recuento en petrifilm
Leche ultra pasteurizada	Esterilidad comercial. (Medio de cultivo BHI)	Recuento en placa por profundidad
Leche saborizada y saborizada con avena	Esterilidad comercial. . (Medio de cultivo BHI)	Recuento en placa por profundidad
Refresco liquido en bolsa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aerobios Mesófilos. (Agar plate count y petrifilm).</li> <li>• Coliformes totales y fecales (Medio de cultivo VRBL y petrifilm de coliformes).</li> <li>• Recuento, Mohos y</li> </ul>	Recuento en placa por profundidad o recuento en petrifilm

	Levaduras. (Medio de cultivo YGC y petrifilm).	
Gelatinas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coliformes totales (Medio de cultivo VRBL y petrifilm de coliformes).</li> <li>• Aerobios Mesófilos Agar plate count y petrifilm).</li> <li>• Mohos y Levaduras (Medio de cultivo YGC y petrifilm).</li> <li>• Recuento de esporas de <i>Clostridium spp</i> sulfito reductor. (Medio de cultivo SPS)</li> </ul>	Recuento en placa por profundidad o recuento en petrifilm. Las esporas se realizan en tubo por anaerobiosis.
Análisis a materias primas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coliformes totales (Medio de cultivo VRBL y petrifilm de coliformes),</li> <li>• Aerobios Mesófilos Agar plate count y petrifilm)</li> <li>• Mohos y Levaduras (Medio de cultivo YGC y petrifilm).</li> <li>• Recuento de esporas de <i>Clostridium spp</i> sulfito reductor. (Medio de cultivo SPS)</li> </ul>	Recuento en placa por profundidad o recuento en petrifilm. Las esporas se realizan en tubo por anaerobiosis.
Análisis de aguas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coliformes fecales, totales (Medio Agar Chromocult)</li> <li>• Aerobios mesófilos.</li> </ul>	Filtración por membrana
Análisis de ambientes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aerobios mesófilos. (Agar plate count)</li> <li>• Mohos y levaduras (Agar YGC )</li> </ul>	Sedimentación.
Análisis de leche cruda, ganaderos y rutas de proveedores	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aerobios mesófilos (petrifilm par aerobios)</li> <li>• Análisis del <i>bacilo Sporothermodurans</i></li> </ul>	Choque térmico

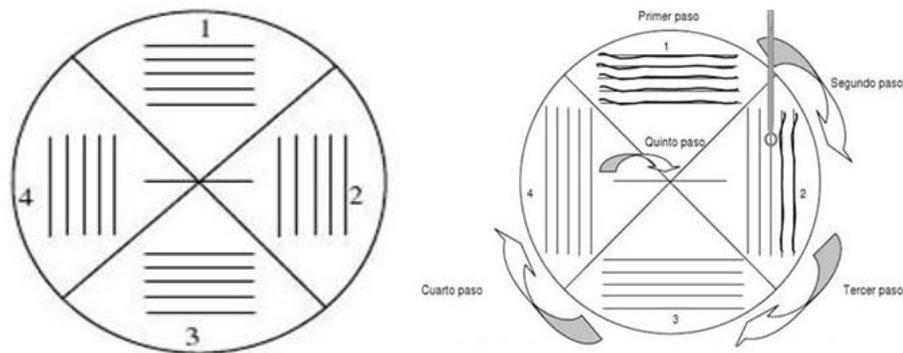
## 4.5 PROTOCOLO PARA TEST DE PRODUCTIVIDAD Y SELECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

### 4.5.1 Método Ecométrico De Control De Medio De Cultivo VRBL

Se tomó un cultivo fresco de una *E. coli* ATCC 8739 que ha sido enriquecida en un medio nutritivo Agar plate count la cual corresponde a una bacteria perteneciente al grupo de los coliformes y un microorganismo control *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, ambas se encontraban en fase cuatro, posteriormente de esta se realizó siembra por agotamiento la cual fue la cepa de trabajo fase cinco.

Se prepararon las cajas de Petri con los medios de cultivo Agar VRBL de casa comercial CONDA y HIMEDIA con un espesor del mismo para todas no más de 4mm y un aproximado de 15 ml, se dejaron secar las cajas invertidas. Se procedió a dividir el medio de la placa en cuatro cuadrantes. Se tomaron tres cajas de cada medio es decir de cada casa comercial dos para evaluar el test ecométrico una con la ATCC referente, una con la ATCC interferente y las dos cajas de control de los medios de cultivo. También se tuvo en cuenta realizar un control en medio plate count de las cepas de referencia de manera que se garantice el crecimiento de estas. Posteriormente se incubaron 37°C/24 horas.

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



(Mosserl, 2003)

## **4.6 PROTOCOLO PARA LA VALIDACIÓN SECUNDARIA DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE COLIFORMES POR RECuento EN PLACA DE MEDIOS DE CULTIVO EMPLEANDO UNA MATRIZ LÍQUIDA**

### **4.6.1 Preparación Del Inóculo Estándar De Trabajo**

En primera instancia, se utilizó un patrón MacFarland comercial 0.5 para realizar el McFarland, de la cepa se tomaron 3 o 5 colonias bien aisladas y de igual morfología y se inocularon en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de una solución de agua peptonada 1 %. Esta solución se incubó a 35-37 °C hasta que se alcanzó la turbidez del estándar equivalente al 0.5 de McFarland (2 - 4 h). Posteriormente, se realizaron siembras en profundidad de diluciones seriadas hasta  $10^{-7}$ , obteniendo resultados de los cuales se tuvieron en cuenta de diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ ; que aunque se pudieron contar, eran demasiado altos para la concentración que se deseaba trabajar, lo cual indicaba un problema con el patrón comercial.

Debido a esto, se procedió a la realización de un patrón estándar MacFarland 1 equivalente a  $3,0 \times 10^8$  UFC /mL: A partir de la cepa de referencia certificada *Escherichia coli* ATCC 8739 en fase logarítmica de crecimiento se realizó un barrido en la caja de petri adicionando 9 ml de agua peptona al 0.1%, realizando la remoción con un asa de drigalski; posteriormente se recuperó el homogenizado con la cepa concentrada en un tubo de ensayo y se procedió a estandarizar la cepa en concentración 1.0 de MacFarland. Cuando se obtuvo las concentraciones deseadas se procedió a realizar diluciones en base 10, con agua peptona al 0.1%.

Los resultados de la elaboración de la escala química del patrón Mcfarland, se les realizó la respectiva lectura de absorbancia a D.O. 625 nm con un espectrofotómetro UV visible Thermo Scientific serie Génesis 10s, el cual fue proveído por un laboratorio externo ya que la Pasteurizadora Santo Domingo no cuenta con dicho equipo. Este patrón fue realizado con el fin de comparar la concentración bacteriana de forma visual y espectrofotométrica a través de suspensiones microbiológicas ajustadas a un patrón químico, facilitando la determinación del número de bacterias por mililitro presente en la muestra, y permitiendo obtener una concentración conocida durante la elaboración del proceso de validación. (Las evidencias fotográficas de este procedimiento fueron omitidas dentro del trabajo debido a políticas de privacidad del laboratorio externo).

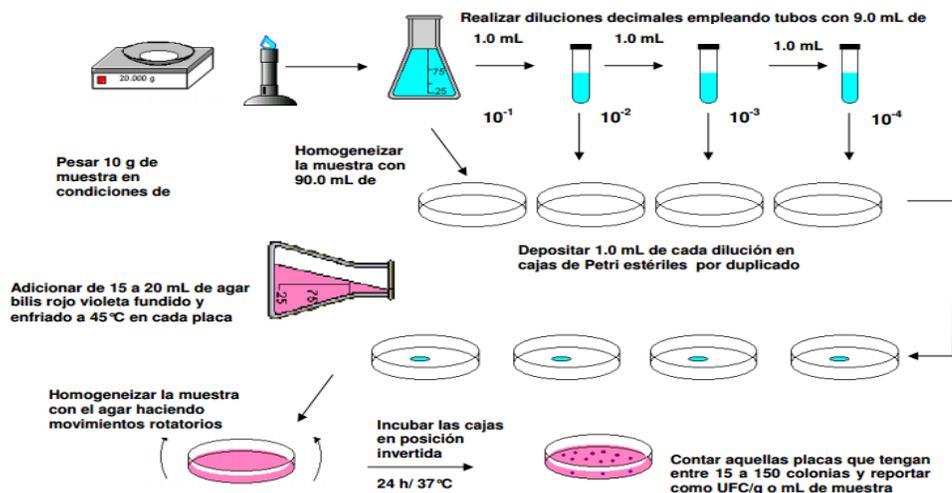
#### 4.6.2 Verificación De la productividad del Medio De Cultivo Por Recuento En Placa

A partir de diluciones seriadas del patrón estándar se sembró por duplicado añadiendo 1000uL de cada dilución en placas de Petri estériles, a continuación se vertieron 15 mL de agar VRB atemperado a más o menos 45 – 47°C. Se homogenizó cuidadosamente; una vez solidificado el medio de cultivo se incubó a 36°C (NTC 4092).Las diluciones se sembraron por duplicado con cada uno de los medios de cultivo analizar de esta manera se obtuvieron resultados que permitieron verificar la capacidad de promoción del medio de cultivo. Para los recuentos y reporte de resultados se tuvo en cuenta la NTC 4458.

##### 4.6.2.1 Determinación De Coliformes Por Recuento En Placa

La técnica utilizada para la determinación de coliformes se llevó a cabo con el medio selectivo Bilis rojo violeta (se trabajó basado en le NTC 4458).

Figura 2. Esquema de la metodología de recuento en placa.



.Fuente: autor

#### 4.6.3 Validación secundaria del método de determinación de coliformes por recuento en placa.

Una vez se estandarizó el inóculo bacteriano se procedió a realizar el ensayo con la matriz líquida, tomando como referencia agua peptonada

tamponada estéril. Para los ensayos de validación, la matriz evaluada fue un derivado lácteo, no especificado por políticas internas de la empresa.

A la matriz del derivado lácteo se inocularon tres tubos con dilución  $10^{-1}$  la primera dilución del derivado se inoculó con 500 uL de la concentración  $10^{-6}$  del patrón McFarland (concentración alta); la segunda dilución  $10^{-1}$  se inoculó con 300uL de la dilución  $10^{-7}$ (concentración media) y la tercera  $10^{-1}$  con 200uL de la dilución  $10^{-7}$  (Concentración baja). Cada una de las diluciones fueron sembradas por duplicado los medios agar VRBL CONDA y agar VRBL HIMEDIA previamente evaluados, incubando luego a 37°C. Transcurridas 24 horas, fue realizado el recuento de las colonias características del microorganismo referente empleado, *E. coli*.

Como referencia, se realizó igual procedimiento de las siembras del patrón MacFarland, variando la matriz a agua peptonada tamponada 0.1 %, esto es, un tubo con 500 uL de la concentración  $10^{-6}$  del patrón McFarland (concentración alta); otro con 300uL de la dilución  $10^{-7}$ (concentración media) y un último tubo con 200uL de la dilución  $10^{-7}$ .

## 5 CONOGRAMA DE ACTIVIDADES

	DICIEMBRE				ENERO				FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO			
SEMANAS/ ACTIVIDADES	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Inducción																												
Muestreo rutinario.																												
Análisis de producto UHT.																												
Análisis de derivado lácteo terminado																												
Análisis de gelatinas y refrescos saborizados.																												
Análisis de ambientes.																												
Análisis de aguas.																												
Análisis de materias primas.																												
Diseño del proyecto																												
Reactivación cepas ATCC																												
Estandarización del patrón estándar e inoculación en la matriz líquida																												
Estructura del trabajo																												
Entrega del trabajo																												
Sustentación del trabajo																												

## 6 RESULTADOS Y ANÁLISIS

Se realizaron control de ambientes en cada proceso que se realizaron los ensayos en los cuales los resultados fueron favorables demostrando que el proceso de limpieza y desinfección del área de trabajo se estaba realizando adecuadamente.

**Figura 3.**Control de ambientes en cabina de flujo laminar.



### 6.1 VERIFICACIÓN DE ESTERILIZACIÓN DE AUTOCLAVES

Para la verificación de la eficacia de la esterilización tanto en el autoclave de material limpio como en la de material contaminado se utilizó el indicador biológico Sterikon®, el cual consiste en ampollas que contienen esporas de *Geobacillus stearothermophilus* que se someten a las condiciones del tratamiento térmico (esterilización) y se incuban a temperatura de 60°C +/- 2 por 48 horas.

Tras las verificaciones realizadas a las autoclaves se pudo evidenciar que proceso de esterilización es efectivo, ya que las ampollas no presentaron viraje de color por la ausencia de crecimiento del microorganismo, el cual no es resistente a la temperatura y presión del autoclave.

### 6.2 CONTROL DE ESTERILIDAD DE MEDIOS DE CULTIVOS.

Cada vez que se prepara cualquier cantidad de medio de cultivo, a este se le debe realizar control de esterilidad que consiste en servir el medio en una caja de petri o tubo de ensayo, en caso de caldos de cultivo, e incubarlos a su respectiva temperatura y tiempo de incubación, luego de pasar el tiempo de incubación se observa si hubo crecimiento de microorganismos en la caja

de petri y turbidez en el caso de los medios líquidos en tubo de ensayo, siendo satisfactoria la prueba al observarse ausencia de estos.

### 6.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE REFERENCIA

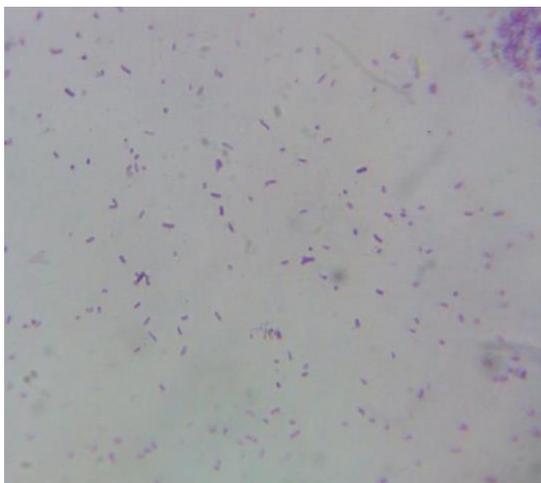
Las cepas de referencia empleadas cumplieron con las características microscópicas (tabla 5) y macroscópicas (tabla 6) propias de las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, según lo establecido en el manual de Bergey.

**Tabla 6.** Pruebas confirmativas de cepas de referencia.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Tinción de Gram: bacilos Gram negativos. Catalasa: positiva. Oxidasa: negativo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	Tinción de Gram: Cocos Gram positivos, agrupados en racimos. Catalasa: positiva. Oxidasa: negativo.

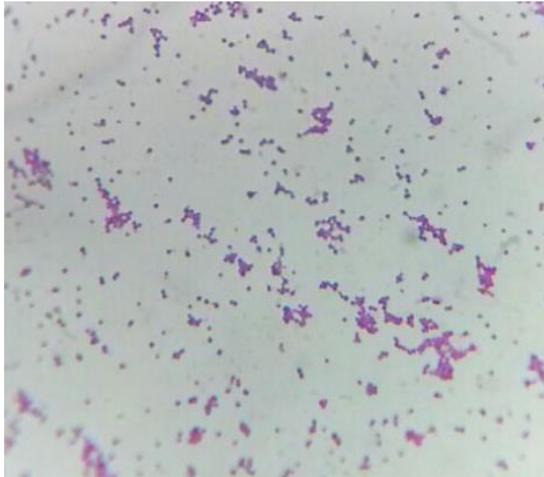
Fuente: autor.

**Figura 4.** Tinción de Gram *Escherichia coli* ATCC 8739 100 X.



Fuente: autor.

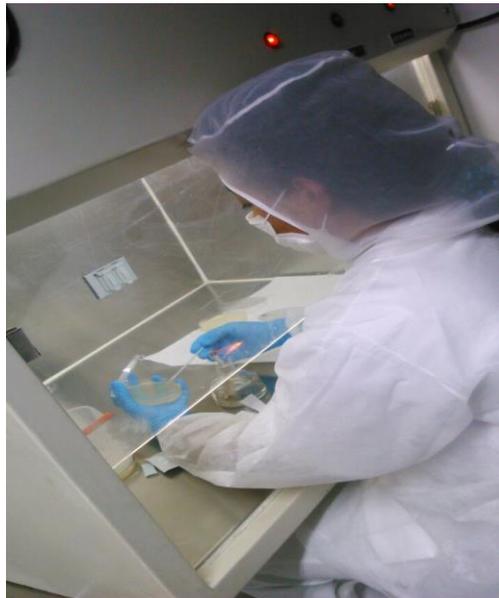
**Figura 5.** Tinción de Gram *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. 100x.



Fuente: autor

Al realizar la activación de las cepas, luego del cuarto pase se procedió a realizar pruebas confirmativas catalasa y oxidasa.

**Figura 6.** Activación de la cepa.



Fuente: autor

**Figura 7.** Prueba de Catalasa y oxidasa para *S. aureus* ATCC 6538 (autor)



Fuente: Autor.

**Figura 8.** Prueba de catalasa y oxidasa para *E. coli* ATCC 8739 (autor)



Fuente: Autor.

**Tabla 7.** Características macroscópicas de las cepas de trabajo en medio VRBL.

Microorganismo	Características Macroscópicas en agar VRBL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Colonias rosa rojo con precipitado biliar(Halo precipitado)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	No crece

Fuente: autor

## 6.4 RESULTADOS TEST ECOMÉTRICO

Se determinó la calidad los medios de cultivo evaluados teniendo en cuenta su productividad y selectividad. Los resultados de ICA e ICR fueron calculados a partir del crecimiento obtenido de los microorganismos en cajas de petri (Figura 9): la cepa referente creció con halo sobre la línea inoculada, mientras que la cepa interferente no creció (observándose las líneas de marcador de la caja).

**Figura 9.** Test ecométrico realizado. Las primeras dos cajas muestran el control de los medios de cultivo VRBL CONDA (derecho) y VRBL HIMEDIA (izquierdo). Las filas 2, 3 y 4 están ordenadas de manera que al lado derecho está sembrado el microorganismo interferente *S. aureus* y al lado izquierdo el referente *E. coli*. La fila 2 muestra el crecimiento en agar plate count; fila 3 agar VRBL CONDA y fila 4 agar VRBL HIMEDIA.



Como se observa en las tablas 7 y 8, los dos medios de cultivo evaluados poseen un Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) de 5 para la cepa referente (*Escherichia coli* ATCC 8739) y de 0 para la cepa interferente (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538), lo que demuestra alta la productividad y selectividad del medio, respectivamente (Mossel, 2003).

El Índice de Crecimiento Relativo (ICR), el cual se calcula del cociente entre el ICA del medio de cultivo prueba y el medio de cultivo control (en este caso, los medios VRBL CONDA e HIMEDIA y el medio agar plate count,

respectivamente), permitió demostrar que los medios evaluados poseen la capacidad de recuperar el microorganismo referente un 100 %, dado que el resultado fue igual a 1 (Tabla 7); le ICR de la cepa interferente fue de 0, lo que demuestra una vez más la selectividad de los medios empleados (Mossel, 2003).

**Tabla 8.** Test ecométrico cepa referente *Escherichia coli* ATCC 8739

MICROORGANISMO		ICA	ICR
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739			
PRUEBA ECOMÉTRICA	MEDIO DE CULTIVO		
MEDIO NUTRITIVO	Agar Plate Count	5	1
MEDIO SELECTIVO Y DIFERENCIAL	VRBL(CONDA)	5	1
MEDIO SELECTIVO Y DIFERENCIAL	VRBL(HIMEDIA)	5	1

Fuente: autor.

**Tabla 9.** Test ecométrico cepa interferente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

MICROORGANISMO		ICA	ICR
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538			
PRUEBA ECOMÉTRICA	MEDIO DE CULTIVO		
MEDIO NUTRITIVO	Agar plate count	5	1
MEDIO SELECTIVO Y DIFERENCIAL	VRBL(CONDA)	0	0
MEDIO SELECTIVO Y DIFERENCIAL	VRBL(HIMEDIA)	0	0

Fuente: autor

Para la verificación de la calidad de los medios de cultivo, también se tuvo en cuenta el pH, por lo que se realizaron mediciones de pH de los medios de cultivo que se emplearon en el ensayo, los datos son mostrados en la tabla.

**Tabla 10.** pH de los medios de cultivo empleados.

pH de los medios de cultivo evaluados.		
Medio de cultivo	pH referencia	pH obtenido (promedio)
VRBL HIMEDIA	7.4 +/-2	7,43
VRBL CONDA	7.4 +/-2	7,43
PLATE COUNT	7.0 +/-2	7,04

## 6.5 RESULTADOS DE VALIDACION DE LA METODOLOGÍA DE DETERMINACION DE COLIFORMES POR RECuento EN PLACA

Se buscó que con el patrón McFarland empleado se obtuvieran resultados similares a los especificados en la literatura, tal como se muestran en la tabla 10. Por esto, fueron empleadas las diluciones 6 y 7.

**Tabla 11.** Escala McFarland. Esta tabla permite observar las concentraciones de la escala con sus correspondientes valores esperados a determinada dilución.

ESCALA DE McFARLAND									
No° ESCALA	EQUIVALANTE UFC/mL	DILUCIONES UFC/mL							
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>
0,5	150000000	2E+07	2E+06	150000	15000	1500	150	150	150
1	300000000	3E+07	3E+06	300000	30000	3000	300	30	3
2	600000000	6E+07	6E+06	600000	60000	6000	600	60	6
3	900000000	9E+07	9E+06	900000	90000	9000	900	90	9
4	1200000000	1E+08	1E+07	1E+06	120000	12000	1200	120	12

El método a validar está descrito en la tabla 11, la matriz ensayada fue un derivado lácteo, teniendo como referencia una matriz de agua peptonada tamponada. Para tener valores significativos para la prueba, se estableció un rango de trabajo de 30 a 300 UFC/ mL.

**Tabla 12.** Información del método validado.

INFORMACIÓN DEL MÉTODO A VERIFICAR	
NOMBRE DEL MÉTODO	RECuento DE COLIFORMES TOTALES Y <i>Escherichia coli</i>
REFERENCIA NORMATIVA	NTC 4092 - NTC 4458
TÉCNICA	VERTIDO EN PLACA PROFUNDA
DTECTOR EMPLEADO	VIOLET RED BILE AGAR WITH LACTOSE (VRBL)
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	30
RANGO DE TRABAJO	30-300
UNIDADES DE ENSAYO	UFC/mL
MATRIZ DE ENSAYO	DERIVADO LACTEO

Fuente: autor.

Para validar el método, se tuvieron en cuenta características de repetitividad, reproducibilidad, exactitud y sensibilidad de los datos obtenidos en el ensayo de referencia (matriz de agua peptonada 0.1 %) en las tablas 12, 13 y 14; y en el ensayo prueba (matriz de derivado lácteo). Los resultados fueron determinados a partir de los datos arrojados por la hoja de cálculo EXCEL 2010 empleado. Para esto, se trabajó con datos de recuentos de UFC/mL en términos de logaritmo en base 10, a causa de que en estudios realizados con anterioridad indican que el crecimiento de los microorganismos no se comportan por distribución normal, por tal motivo se hizo necesario realizar la 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.

### 6.5.1 Validación primaria

La validación primaria del método se realizó a una matriz de agua peptonada tamponada 0.1 %, para ello se trabajó con 20 datos por cada uno de los ensayos, el método fue realizado por dos analistas para determinar así la reproducibilidad de los datos, lo que permite además asegurar la confiabilidad de los mismos. Se observa que, al ser convertidos a Logaritmo de UFC/ ml, los datos tienen una mejor distribución (tabla 12).

## 6.5.2 Validación del método en matriz de agua peptonada.

**Tabla 13.** Ensayo número 1 para la estandarización de la matriz agua peptonada.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO													
VARIABLE	<i>Escherichia coli</i>												
MATRIZ	Agua Peptonada Buferada Estéril (Patrón)												
NIVEL DE CONTAMINACIÓN	INÓCULO ALTO				INÓCULO MEDIO				INÓCULO BAJO				
ANALISTA	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		
VALOR ESPERADO	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	
		150	1,65	150	2,18	92	1,96	90	1,95	32	1,51	33	1,52
	1	150	2,18	157	2,20	94	1,97	89	1,95	29	1,46	34	1,53
	2	147	2,17	158	2,20	89	1,95	79	1,90	27	1,43	33	1,52
	3	142	2,15	162	2,21	95	1,98	85	1,93	28	1,45	35	1,54
	4	167	2,22	163	2,21	95	1,98	93	1,97	29	1,46	33	1,52

**Tabla 14.** Ensayo número 2 para la estandarización de la matriz agua peptonada.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO													
VARIABLE	<i>Escherichia coli</i>												
MATRIZ	Agua Peptonada Buferada Estéril (Patrón)												
NIVEL DE CONTAMINACIÓN	INÓCULO ALTO				INÓCULO MEDIO				INÓCULO BAJO				
ANALISTA	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		
VALOR ESPERADO	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	
		150	1,65	150	2,18	90	1,95	90	1,95	32	1,51	33	1,52
	1	138	2,14	145	2,16	97	1,99	95	1,98	30	1,48	32	1,51
	2	174	2,24	164	2,21	89	1,95	94	1,97	31	1,49	31	1,49
	3	155	2,19	164	2,21	86	1,93	97	1,99	33	1,52	33	1,52
	4	154	2,19	170	2,23	85	1,93	96	1,98	29	1,46	32	1,51

**Tabla 15.** Ensayo número 3 para la estandarización de la matriz agua peptonada.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO													
VARIABLE	<i>Escherichia coli</i>												
MATRIZ	Agua Peptonada Buferada Estéril (Patrón)												
NIVEL DE CONTAMINACIÓ	INÓCULO ALTO				INÓCULO MEDIO				INÓCULO BAJO				
ANALISTA	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		
VALOR ESPERADO	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	
		150	1,65	150	2,18	90	1,95	90	1,95	32	1,51	33	1,52
1	153	2,18	145	2,16	99	2,00	98	1,99	33	1,52	27	1,43	
2	151	2,18	173	2,24	88	1,94	99	2,00	27	1,43	28	1,45	
3	162	2,21	156	2,19	85	1,93	89	1,95	29	1,46	29	1,46	
4	154	2,19	165	2,22	87	1,94	79	1,90	30	1,48	30	1,48	

**Tabla 16.** Ensayo número 4 para la estandarización de la matriz agua peptonada.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO													
VARIABLE	<i>Escherichia coli</i>												
MATRIZ	Agua Peptonada Buferada Estéril (Patrón)												
NIVEL DE CONTAMINACIÓ	INÓCULO ALTO				INÓCULO MEDIO				INÓCULO BAJO				
ANALISTA	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		
VALOR ESPERADO	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	
		150	1,65	150	2,18	90	1,95	90	1,95	32	1,51	33	1,52
1	147	2,17	173	2,24	93	1,97	98	1,99	31	1,49	28	1,45	
2	154	2,19	156	2,19	89	1,95	89	1,95	29	1,46	30	1,48	
3	147	2,17	168	2,23	86	1,93	87	1,94	33	1,52	31	1,49	
4	167	2,22	170	2,23	98	1,99	95	1,98	34	1,53	33	1,52	

**Tabla 17.** Ensayo número 5 para la estandarización de la matriz agua peptonada.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO													
VARIABLE	<i>Escherichia coli</i>												
MATRIZ	Agua Peptonada Buferada Estéril (Patrón)												
NIVEL DE CONTAMINACIÓ	INÓCULO ALTO				INÓCULO MEDIO				INÓCULO BAJO				
ANALISTA	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		
VALOR ESPERADO	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	
		150	1,65	150	2,18	90	1,95	90	1,95	32	1,51	33	1,52
1	139	2,14	167	2,22	89	1,95	94	1,97	31	1,49	32	1,51	
2	145	2,16	156	2,19	88	1,94	93	1,97	37	1,57	30	1,48	
3	156	2,19	171	2,23	79	1,90	98	1,99	32	1,51	32	1,51	
4	161	2,21	148	2,17	92	1,96	90	1,95	33	1,52	33	1,52	

Para determinar la repetitividad del ensayo con la matriz líquida agua peptonada se realizó en cinco ocasiones donde se recolectaron datos y se les realizó análisis estadístico individual, es decir, a los analistas por separado, observando que durante la evaluación con esta matriz, ambos estuvieron dentro de los criterios de aceptación arrojados por la hoja de cálculo para coeficiente de variación (15 %), porcentaje de error (+/- 0.5) y porcentaje de recuperación (80 a 120 %). Estos criterios indican respectivamente que el método fue preciso, al ser los datos cercanos entre sí (coeficiente de variación y porcentaje de error) y exacto, pues los datos fueron cercanos al valor de referencia (porcentaje de recuperación), demostrando que el método es repetitivo (tabla 18).

**Tabla 18.** Estadística de repetitividad en matriz de agua peptonada.

REPETIBILIDAD							
ESTADÍSTICA INDIVIDUAL	N DATOS	20	20	20	20	20	20
	PROMEDIO	2,18		1,95	1,96	1,49	1,49
	DESVT	0,0267		0,0247		0,0355	
	VARIANZA	0,000715453	0,000569831	0,000611124	0,000838725	0,001259199	0,000925602
	COEFICIENTE	1,2245		1,2650		2,3872	
	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	15 %					
	CUMPLE	SI	si	SI	si	SI	si
	ERROR %	0,008		-0,009	0,008	-0,019	-0,024
	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	± 0.5					
	CUMPLE	SI	si	SI	SI	SI	SI
	RECUPERACIÓN %	100		100	100	99	98
	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	80% a 120%					
	CUMPLE	SI	si	SI	SI	SI	SI

Fuente: autor

Para determinar la reproducibilidad del método, se realizó un análisis estadístico total, el cual analizó la combinación de los datos obtenidos por los dos analistas para cada uno de los inóculos. Aquí se tienen nuevamente en cuenta los parámetros de coeficiente de variación que permite observar las dispersiones entre los analistas, el porcentaje de error que da a conocer la exactitud de un valor estimado y porcentaje de recuperación, con iguales valores límite.

El porcentaje de error nos permitió observar la diferencia entre la concentración de medida del analito en una muestra a la cual le adicionamos una concentración estándar conocida. Se observó que hubo un incremento en el coeficiente de variación de los datos respecto al análisis

hecho individualmente, sin embargo, dicho aumento no es suficientemente alto y se encuentra dentro del rango establecido (tabla 19). Determinando así que el método, además de ser repetitivo, es reproducible en este tipo de matriz.

**Tabla 19.** Estadística de reproducibilidad en matriz de agua peptonada.

REPRODUCIBILIDAD				
ESTADÍSTICA TOTAL	N DATOS	40	40	40
	PROMEDIO	2,20	1,96	1,49
	DESVT	0,0277	0,0269	0,0329
	VARIANZA	0,000766091	0,000722267	0,00108117
	COEFICIENTE	1,26	1,37	2,21
	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	15 %		
	CUMPLE	SI	SI	SI
	ERROR %	2,196010446	-42833,04176	-42955,5095
	ACEPTACIÓN	± 0.5		
	CUMPLE	si	SI	SI
	RECUPERACIÓN %	100,92	99,72	99,03
	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	70% a 120%		
	CUMPLE	SI	SI	SI

Fuente: autor

Se determina que el método es repetitivo dado que se los recuentos obtenidos de los 20 datos, tuvieron una varianza inferior al 15 % establecida como límite de este criterio y reproducible dado que los dos analistas obtuvieron resultados similares a los esperados, es decir, es un método preciso; es además, exacto dado que los valores obtenidos del recuento en placa cumplieron con el límite de aceptación de la recuperabilidad bajo las tres concentraciones de la cepa (se recuperó el microorganismo a un 100 %, esto es, se obtuvo el crecimiento en UFC/ ml esperado).

Cabe resalta que, se observó que el coeficiente de variación de los datos tanto en el análisis individual como en el total, fue mayor para el inóculo bajo, de igual forma, el porcentaje de recuperación fue menor, lo que confirma la teoría de que a mayor número de diluciones, es mayor la posibilidad de conducir a errores. Se establece entonces que para esta matriz, el método arroja mejores resultados bajo el inóculo medio, el cual fue el de mayor sensibilidad.

### 6.5.3 Validación secundaria

La validación secundaria del método, fue realizada sobre una matriz de un derivado lácteo, la cual asemeja las características encontradas durante los ensayos de rutina realizados en la empresa. Para esta evaluación, fueron tomados 13 datos por 2 analistas para tres concentraciones diferentes del inóculo (tabla 20, 21 y 22).

**Tabla 20.** Ensayo número 1 Matriz derivado lácteo.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO													
VARIABLE	<i>Escherichia coli</i>												
MATRIZ	Agua Peptonada Buferada Estéril (Patrón)												
NIVEL DE CONTAMINACIÓ	INÓCULO ALTO				INÓCULO MEDIO				INÓCULO BAJO				
ANALISTA	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		
VALOR ESPERADO	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	
		150	1,65	150	2,18	90	1,95	90	1,95	32	1,51	33	1,52
1	150	2,18	163	2,21	90	1,95	89	1,95	27	1,43	30	1,48	
2	147	2,17	156	2,19	95	1,98	90	1,95	30	1,48	28	1,45	
3	145	2,16	170	2,23	94	1,97	85	1,93	31	1,49	29	1,46	
4	146	2,16	163	2,21	80	1,90	96	1,98	32	1,51	27	1,43	

**Tabla 21.** Ensayo número 2 Matriz derivado lácteo

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO													
VARIABLE	<i>Escherichia coli</i>												
MATRIZ	Agua Peptonada Buferada Estéril (Patrón)												
NIVEL DE CONTAMINACIÓ	INÓCULO ALTO				INÓCULO MEDIO				INÓCULO BAJO				
ANALISTA	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		
VALOR ESPERADO	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	
		150	1,65	150	2,18	90	1,95	90	1,95	32	1,51	33	1,52
1	158	2,20	154	2,19	88	1,94	90	1,95	30	1,48	29	1,46	
2	165	2,22	156	2,19	86	1,93	88	1,94	32	1,51	32	1,51	
3	148	2,17	147	2,17	89	1,95	99	2,00	33	1,52	30	1,48	
4	155	2,19	164	2,21	90	1,95	86	1,93	29	1,46	27	1,43	

**Tabla 22.** Ensayo número 3 Matriz derivado lácteo

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO													
VARIABLE	<i>Escherichia coli</i>												
MATRIZ	Agua Peptonada Buferada Estéril (Patrón)												
NIVEL DE CONTAMINACIÓ	INÓCULO ALTO				INÓCULO MEDIO				INÓCULO BAJO				
ANALISTA	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		
VALOR ESPERADO	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	UFC/mL	Log10 UFC/mL	
	150	1,65	150	2,18	90	1,95	90	1,95	32	1,51	33	1,52	
1	150	2,18	163	2,21	94	1,97	103	2,01	34	1,53	33	1,52	
2	162	2,21	163	2,21	99	2,00	89	1,95	31	1,49	28	1,45	
3	164	2,21	152	2,18	103	2,01	101	2,00	29	1,46	33	1,52	
4	157	2,20	164	2,21	100	2,00	87	1,94	26	1,41	29	1,46	
5	160	2,20	162	2,21	102	2,01	98	1,99	29	1,46	27	1,43	

Fuente: autor.

En cuanto a criterio de repetitividad, se observa (tabla 23) que el analista 1 tuvo mejores resultados, pues la varianza, el porcentaje de error y el porcentaje de recuperación de los datos, fue inferior al límite en los tres casos de estudio (inoculo alto, medio y bajo). Contrario a esto, los recuentos obtenidos por el analista 2 no fueron repetitivos bajo el ensayo con el inoculo alto, no cumpliendo con los tres criterios de aceptación establecidos. Lo que conduce a especificar que el método evaluado no es sensible a concentraciones más altas de la matriz y/o inoculo.

**Tabla 23.** Estadística de repetitividad en matriz del derivado lácteo.

REPETIBILIDAD							
ESTADÍSTICA INDIVIDUAL	N DATOS	13	13	13	13	13	13
	PROMEDIO	2,19		1,97	1,96	1,48	1,47
	DESVT	0,0200		0,0319		0,0332	
	VARIANZA	0,000399012	0,000297431	0,001017208	0,000811968	0,001099176	0,00096903
	COEFICIENTE VARIACIÓN	0,9129		1,6208		2,2412	
	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	15 %					
	CUMPLE	SI	NO	SI	NO	SI	NO
	ERROR %	0,012		0,014	0,010	0,002	-0,010
	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	± 0.5					
	CUMPLE	SI	NO	SI	SI	SI	SI
RECUPERACIÓN %	101		101	101	100	99	
CRITERIO DE ACEPTACIÓN	80% a 120%						
CUMPLE	SI	NO	SI	SI	SI	SI	

Fuente: autor.

Para esta validación, se debe tener en cuenta que además de la diferencia en la concentración del inóculo, existe una diferencia en la matriz, puesto que esta se encuentra diluida tres veces y las diluciones no fueron evaluadas individualmente con cada uno los inóculos, es decir, la matriz no es homogénea. Lo anterior se ve reflejado y/o explica la diferencia de los resultados obtenidos en cuanto a repetitividad y reproducibilidad del método: no cumplió con estos criterios cuando se evaluó en el inóculo alto.

**Tabla 24.** Estadística de reproducibilidad en matriz del derivado lácteo.

REPRODUCIBILIDAD				
ESTADÍSTICA TOTAL	N DATOS	26	26	26
	PROMEDIO	2,20	1,97	1,47
	DESVT	0,0198	0,0297	0,0321
	VARIANZA	0,000392792	0,000880407	0,001031519
	COEFICIENTE VARIACIÓN	0,90	1,51	2,18
	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	15 %		
	CUMPLE	SI	SI	SI
	ERROR %	2,195679482	-42833,03375	-42955,52681
	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	± 0.5		
	CUMPLE	NO	SI	SI
	RECUPERACIÓN %	100,90	100,61	99,73
	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	70% a 120%		
	CUMPLE	SI	SI	SI

Fuente: autor.

La diferencia entre los resultados de repetitividad y reproducibilidad encontrados entre las dos matrices evaluadas, es debido por una parte a la diferencia en las características fisicoquímicas de las mismas, pues, al ser un derivado fermentado (evaluado), la densidad del mismo es de 1.044 g/cm<sup>3</sup>, mientras que la densidad del agua peptonada (de referencia) es cercana a la del agua, esto es 1.0 g/cm<sup>3</sup>; además de la cantidad de nutrientes y por tanto de sólidos disueltos, entre otras características que influyen directamente en el manejo de los instrumentos como la micropipeta. En segundo lugar, la cantidad de microorganismos presentes pudo influenciar en que los datos no fueran los esperados, puesto que la matriz del derivado lácteo favorecía (incrementaba) el crecimiento de la cepa debido a la mayor cantidad de nutrientes que presenta respecto a la matriz de referencia; lo cual dificulta los recuentos realizados por posible solapamiento entre las colonias,

conduciendo a errores como la omisión o no conteo de colonias por aglomeraciones, es decir, falsos negativos.

## 7 CONCLUSIONES

De la validación del método de determinación de coliformes por recuento en placas en los medios de cultivos comerciales se puede concluir que no se pudo validar en el medio de cultivo VRBL de las casas comerciales HIMEDIA y CONDA por lo cual se dan recomendaciones y sugerencias para que al repetir la técnica se pueda determinar la validación.

Las características fisicoquímicas de las muestras interfieren en la aplicabilidad del método, debido a que para la matriz de agua peptona se obtuvieron resultados favorables en cuanto a todos los criterios evaluados: exactitud (porcentaje de recuperación se encuentra entre el 100 y 120%) y precisión (reproducibilidad 70-120% y repetitividad 80 - 120%) bajo las tres concentraciones. Sin embargo, al aplicar el método a la matriz del derivado lácteo, estos criterios variaron respecto a la concentración de la matriz y el microorganismo, siendo que para la mayor concentración estudiada (alta), no fue exacto ni preciso el método.

De este estudio se deduce que la validación no se pudo realizar como se esperaba debido a la irregularidad que se presentó con la obtención de los datos lo cual es demostrado en el análisis estadístico.

Las concentraciones bajas del ensayo es decir 30 y 90 UFC empleadas en el método presentan una sensibilidad favorable contrario a lo observado a medida que aumenta la concentración del patrón.

En cuanto a los medios de cultivo VRBL CONDA y VRBL HIMEDIA empleados para realizar la validación del método de recuento en placa en el laboratorio de Pasteurizadora Santo Domingo se pudo demostrar por medio de la técnica del test ecométrico que son de alta calidad, puesto que durante la aplicación de este se obtuvo ICA de 5 y ICR de 1 en los dos para la cepa *E. coli* referente e ICA e ICR de 0 para la cepa *S. aureus* interferente, demostrando así su productividad y selectividad.

## 8 RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Se recomienda la realización de nuevos ensayos donde se evalué la diferencia del recuento bacteriano en la matriz sin diluir con las concentraciones del inóculo evaluadas en el presente estudio (alta, media y baja), de esta manera se podrá establecer si la diferencia encontrada entre los inóculos alto, medio y bajo en la matriz del derivado lácteo fue debida a las características de la misma o a la concentración microbiana, o de ambas.

Es indispensable para la realización de este tipo de análisis tener el conocimiento y el alcance de este tipo de procedimientos, también es de suma importancia crear un cronograma en el cual se estipule el tiempo adecuado para la realización de más ensayos debido a que de esta manera se fortalecería los resultados y por consiguiente análisis de la validación.

Es recomendable que para la realización de este tipo de procedimientos el laboratorio tenga la facilidad de obtener un equipo de medición de absorbancias lo cual ayudaría a la disminución de porcentajes de error debido a que el uso de un patrón comercial existente no tiene igual exactitud y precisión que la espectrofotometría.

## 9 GLOSARIO

**Cepa de referencia:** Microorganismo obtenido directamente de una Colección de Cultivos de Referencia y definido como mínimo a nivel de género y especie, catalogado y descrito conforme a sus características y preferiblemente procedente de productos alimenticios para consumo humano o animal, de un entorno de producción de alimentos para consumo humano o animal, o de agua, según corresponda. (ISO 1133 2024).

**Certificación:** es la acción llevada a cabo por una entidad independiente de las partes interesadas mediante la que se manifiesta que una organización, producto, proceso o servicio, cumple los requisitos definidos en unas normas o especificaciones técnicas.

**CONTROL DE CALIDAD:** todas las medidas tomadas, incluyendo el establecimiento de especificaciones, muestreo, análisis e informe de análisis, para asegurar que las materias primas, productos intermedios, materiales de envase y productos farmacéuticos terminados cumplan con las especificaciones establecidas para identidad, contenido, pureza y otras características.

**Estéril:** todo aquel objeto o sustancia que está libre de microorganismos y que es incapaz de producir cualquier forma de vida.

**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.

**Medios de cultivo:** Consta de un gel o solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales, en condiciones favorables de pH y temperatura.

**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.

**SUPERFICIE:** El área es una medida de extensión, expresada en unidades de medidas.

**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

AOAC oficial method 991.14 coliform and *Escherichia coli* counts in foods.

Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B. Serrano y O. Velázquez. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

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.

Camaró Sala; María Luisa. García Martínez Rosana. Procedimientos De Microbiología Clínica Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. 2013. Pág. 2-3.

Cañes María Guadalupe, Monserrat Alejandro. VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETRIC PHOSPHORUS DETERMINATION, Volumen XVII, número III, 2015. Universidad de Sonora Mexico.

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.

Casado Mª, Cabezas G, Anguita, MEDIOS DE CULTIVO EN UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA, 2012, USA.  
<https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>. (22/03/2017)

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

Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos.  
[http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Guia de interpretación de resultados microbiologico](http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Guia%20de%20interpretaci3n%20de%20resultados%20microbiol3gicos) (04/04/2017).

Guía Técnica Colombiana GTC 171 microbiología de alimentos y alimentos para animales. Guía para la preparación y producción de medios de cultivo. Guía general para los ensayos de desempeño de medios de cultivo. 2008.

GUIA TECNICA COLOMBIANA GTC 78. 2002.

NTC-ISO/IEC Colombiana 17025 2005. Norma Internacional establece los requisitos y parámetros generales para la competencia en la realización de ensayos y/o de calibraciones, incluidos métodos normalizados, no normalizados y desarrollados por el mismo laboratorio.

ISO 11133:2014. Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua. Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo.

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

NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA 4458. Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos.

NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA 4092. Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos.

MINSAP. Control de la calidad de los medios de cultivos utilizados en el diagnóstico bacteriológico. Norma Ramal. Ciudad de La Habana: MINSAP, 1990. p. 14.

Ortiz L. Patrones de Turbidez Microbiología Industrial. Universidad de Pamplona Departamento de Microbiología. Pamplona (N.S)

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

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 Bogotá D.C. 57 .

Ospino G. 2013. Filtración por membrana para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas. (Tesis de pregrado) Universidad de Pamplona. Pamplona, Colombia.

Pascual A. Calderón V. Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas 2° edición Días de santos 2000 pág. 40.

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.

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

Sánchez. J. Laso 2005 SITUACIÓN DE LA VALIDACIÓN DE LOS ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS EN LOS LABORATORIOS 1 1- Gabinete de Servicios para la Calidad (GSC). C/Cocheras, 4 Portal G Bajo 4 – 28007 Madrid. E-mail: [gscsal@gscsal.com](mailto:gscsal@gscsal.com).

Sánchez, Luz Sandra; Gelvez Cesar, Montañó Raúl. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. Guía para la evaluación de desempeño de métodos de prueba microbiológicos. Vigente a partir de 2011- 03- 28.

Soledad 2009. La validación en la industria. Pág. 33.

Soler J. 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.

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

Villalobos A; Calderón. EVALUATION FOR ECOMÉTRIC METHOD OF AGAR OBTAINED OF COLOMBIAN RED ALGAE. UNIVERSITAS

SCIENTIARUM Revista de la Facultad de Ciencias Vol. 12, edición especial III, 57-65.

ZENDEJAS, G; AVALOS, H & SOTO, M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. /En Revista: Biomed. 2014. vol. 25:p: 129143. Estado de Michoacán de Ocampo, México.3M.

# 11 ANEXOS

## Anexos 1. Certificado ATCC *Escherichia coli*.



**Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release**

<b>Specifications</b> Microorganism Name: <i>Escherichia coli</i> Catalog Number: D483 Lot Number: 483-572 Reference Number: ATCC® 8739™ Purity: > 99.9% of Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2018/6/30 Release Information: Quality Control Technologist: Jennifer Holub Release Date: 2016/8/4
<b>Performance</b>	
<b>Microscopic Features:</b> Medium to large, gray, mucoid, convex. <b>Microscopic Features:</b> Gram negative straight rod.	<b>Medium:</b> SBAP <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive   Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
<p><small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vials: Although the Vials panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <div style="display: flex; align-items: flex-start;"> <div style="margin-right: 20px;">  </div> <div> <p>(1) The ATCC Licensed Derivative System, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC testing marks are trademarks of ATCC, Microbiology, Inc. It is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> </div> </div> <div style="margin-top: 10px;"> <p>(2) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> </div> <div style="margin-top: 10px;">                   TERTING CERT #2655-01             </div>	

**ANEXO 2. Certificado ATCC *Staphylococcus aureus*.**



**Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release**

<b>Specifications:</b> Microorganism Name: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Catalog Number: 0455 Lot Number: 485-366 Reference Number: ATCC® 5338™ Purity: > 99.9% of Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2018/3/31 Release Information: Quality Control Technologist: Jennifer Holub Release Date: 2016/5/20
<b>Performance</b>	
<b>Microscope Features:</b> Medium to large, convex, circular, glistening, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - both light gold and darker gold colonies may be present.	<b>Medium:</b> SBAP
<b>Microscope Features:</b> Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.	<b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative
 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE	
Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.	
Note for Vial(s): Although the Vial(s) panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.	
Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and biosecurity information.	
Individual products are traceable to a recognized culture collection.	
	(1) The ATCC Licensed Derivative System, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC testing marks are trademarks of ATCC Microbiology, Inc. & licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® culture.
	(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.
TERTINO CERT #2635-01	

**ANEXO 3. Instructivo de activación de las cepas de referencia.**

ACTIVIDAD	DESCRIPCION	RESPONSABLE
<p>Activación de cepa de referencia</p>	<p><b>1</b> Deje con la tapa de Labi-Esta™ (KWIK-STIK™) sin abrir se equilibre a temperatura ambiente. Abra la tapa enganchada por la manija y retire la unidad KWIK-STIK™.</p> <p><b>2</b> Arroje la parte de la lengüeta de la etiqueta y peguela a la placa del cultivo primario o a la ficha de control de calidad. No desmonte el dispositivo durante la hidratación.</p> <p><b>3</b> Frotanque todo una vez la lengüeta en la parte superior del KWIK-STIK™ (lado por debajo del manillar del líquido de la ampolla que se encuentra en la tapa para liberar el líquido hidratante).</p> <p><b>4</b> Sumérjalo verticalmente y péguelo suavemente sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido a través del cap y hacia la parte inferior de la unidad que contiene el patógeno. Después que el líquido hidratante haya a través con un homocinético y hacia la parte inferior de la unidad que contiene el patógeno.</p> <p><b>5</b> Frotando la parte inferior de la unidad, frote el patógeno en el líquido hasta que la suspensión del patógeno sea homogénea.</p> <p><b>6</b> Sellar y fondo <b>INMEDIATAMENTE</b> el bastercillo con el material hidratado y transfiera al medio de agua.</p> <p><b>7</b> Inocule la placa o placas de cultivo primario pasando suavemente el bastercillo al tiempo que lo gira por un tercio de la placa.</p> <p><b>8</b> Con un lazo estéril, forme estrías longitudinales para facilitar el aislamiento de las colonias.</p> <p><b>9</b> Utilizando procedimientos de eliminación adecuados para materiales de riesgo biológico, deseché el KWIK-STIK™.</p> <p><b>10</b> Incube <b>INMEDIATAMENTE</b> la placa o placas de cultivo primario inoculada a la temperatura y en las condiciones adecuadas para el microorganismo.</p> <p>Fuente: Microbiologics</p>	<p>Pasante de microbiología</p>

# ANEXO 4: Certificado de analisis de medio de calidad VRBL CONDA.



## QUALITY CONTROL CERTIFICATE

PRODUCT: VIOLET RED BILE WITH LACTOSE AGAR (VRBL) (ISO 4832)

CAT Nº: 1093

BATCH: 604131

RE-TEST DATE: 2020/04

QC Date: 2016/04/13

pH: 7.30

We hereby certify that the above mentioned culture medium has been approved by the Quality Control Laboratory.

### FORMULA IN g/l:

Lactose.....	10.0	Bile Salts.....	1.5
Gelatin Peptone.....	7.0	Neutral Red.....	0.03
Sodium Chloride.....	5.0	Crystal Violet.....	0.002
Yeast Extract.....	3.0	Bacteriological Agar.....	15.0

The pH after preparing the medium and at room temperature: 7.4 ± 0.2

### PHYSICAL AND CHEMICAL TEST

Appearance:..... fine powder

Solubility:..... w/o nests

Color:..... beige reddish

Color of the prepared medium: purple-red

### MICROBIOLOGICAL TEST

The following results were obtained in the performance of the medium from type cultures after incubation at a temperature of 35 ± 2°C and observed after 18-24 hours\*.

Microorganisms	Growth	Colony Color	Inoculum (cfu/ml)	Recovery rate (%)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Good	Purple	10 <sup>6</sup> -10 <sup>8</sup>	≥30
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	Good	Purple	10 <sup>6</sup> -10 <sup>8</sup>	≥30
<i>Salmonella gallinarum</i> NCTC 9240	Good	Colorless	10 <sup>6</sup> -10 <sup>8</sup>	≥30
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Inhibited		>10 <sup>8</sup>	≤0.01
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inhibited			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Good	Colorless-beige	10 <sup>6</sup>	≥80

\*According to ISO 4832. Incubation at 30 or 37°C and observed after 24 ± 2 h

According to ISO 11133 (24 ± 2h/30 ± 1°C) Productivity, Selectivity and Specificity

Microorganisms	Inoculum (cfu/ml)	Reference media (cfu)	Media test (cfu)	Productivity Quantitative	Characteristic Reaction	Specificity Qualitative	Selectivity Qualitative
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10 <sup>6</sup>	80	40	88%	Red colonies white precipitation halo		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	10 <sup>6</sup>	45	35	88%	Red colonies white precipitation halo		
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	10 <sup>7</sup> 10 <sup>8</sup>						Inhibited Total
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	10 <sup>7</sup> 10 <sup>8</sup>						Inhibited Total
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 <sup>7</sup> 10 <sup>8</sup>					Colorless-beige colonies	

Reference Media Productivity TSA (E.coli)

Laboratory result: **Satisfactory**

Carmen Ramirez, QC Manager

LABORATORIOS CONDA, S.A.  
C/ La Forja, 9 - 28850 Torrejón de Ardoz (Madrid)  
Phone +34 91 761 02 00 - Fax +34 91 656 82 28

www.condalab.com

## ANEXO 5: Certificado de analisis de patron del inóculo



### CERTIFICADO DE ANALISIS DE PRODUCTO TERMINADO

#### REACTIVO PREPARADO LISTO PARA USO

Reactivo: PATRON DE MACFARLAND N° 0.5  
Presentación: Tubo  
Lote: F17-063  
Fecha de Vencimiento: 21 de agosto de 2017

#### Composición de preparación para 10 ml de PATRON N° 0.5

Ácido sulfúrico 1% 9.95 mL  
Cloruro de bario 1,175% 0.05 mL

#### EVALUACION DE DESEMPEÑO PATRON MACFARLAND N° 0.5

Control físico Químico	
Apariencia	OK
Volumen	OK
Absorbancia 625 nm	0,098

#### • Control de Esterilidad:

No se observa crecimiento Microbiológico, después de 72 Horas de incubación a 37°C.

#### RECOMENDACIONES DE ALMACENAMIENTO y USO

- Almacenar a Temperatura ambiente.
- **NO DEJAR EXPUESTO A LA LUZ**

*Jonatan Arbelaez*

Jonatan Farley Arbelaez  
Coordinador de Control calidad  
Centro productivos

## ANEXO 5: Certificado de análisis del medio de cultivo VRBL HIMEDIA.



Certified : ISO 9001:2008, ISO 13485-2003 and WHO GMP

### Himedia Laboratories Private Limited

23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai - 400086

Website : [www.himedialabs.com](http://www.himedialabs.com), Email : [info@himedialabs.com](mailto:info@himedialabs.com)

### Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M210	Material Name : Brain Heart Infusion Broth	Lot No : 0000287383
Report No.: 04000099792	Date of Report : 07.01.2017	Expiry Date : Jan-2022

#### Appearance

Cream to yellow homogeneous free flowing powder . Observed : Light yellow

#### Colour and Clarity of prepared medium

Light to medium amber coloured, clear solution without any precipitate

#### Reaction

Reaction of 3.7% w/v aqueous solution at 25°C.

#### pH

pH Range :7.20-7.80 Observed : 7.50

#### Cultural Response

Cultural characteristics observed after an incubation at 35-37°C for 24-48 hours.

Organism	Inoculum (CFU)	Growth
<b>Cultural Response</b>		
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	50-100	good-turiant
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	50-100	good-turiant
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	50-100	good-turiant
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	50-100	good-turiant
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	50-100	good-turiant
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 25923	50-100	good-turiant

- ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection
- NCTC and National Collection of Type Culture are registered trade mark of the Health Protection Agency
- All ISO 11133 : 2014 ( E ) control strains are included in the Quality parameter
- Himedia Laboratories Pvt Ltd is certified for ISO 9001-2008, ISO 13485-2003 and WHO GMP.

. Information for BSE/TSE Risk The material was subjected to pH <= 7.0 and/or a temperature in excess of 75°C for no less than 2 hours during the manufacturing process. The bovine raw material for this product was collected entirely from Indian Origin animals in a licensed based establishment. The animals are inspected under a Govt. approved veterinarian's supervision and were apparently free from infectious and contagious diseases. BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy)/ TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathy) and dioxine are not known to exist in India. This material does not contain, nor is derived from the specific risks material as defined in The Maharashtra Animal

HiMedia Laboratories Private Limited  
23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai - 400086  
Website : www.himedialabs.com, Email : info@himedialabs.com

**Certificate of Analysis, Quality and Conformity**

Material Code : M049	Material Name : Violet Red Bile Agar	Lot No : 0000245440
Report No.: 040000596749	Date of Report : 14.10.2015	Expiry Date : Oct-2019

**STATUS OF THE MATERIAL : APPROVED**

This is to certify that this lot passes and it confirms to the above mentioned tests and specifications . The information given here is believed to be correct and accurate, however, both the information and products are offered without warranty for any particular use, other than that specified in the current HiMedia manual or product sheets. The results reported were obtained at the time of release.

**This document has been produced electronically and is valid**

  
Shweta Khare

Microbiologist/Analyst

  
Sarojita Karol

Dy QC/Dy QA Manager

  
Dr. Santosh Kaul

Quality Assurance Manager

14.10.2015

**ANEXO 6: Control de esterilización de autoclave de material estéril.**

		PASTEURIZADORA SANTO DOMINGO CONTROL AUTOCLAVE DE ESTERILIZACIÓN		FR-CC-004			
				VERSION	FECHA	PAGINA	
				2	10/12/2016	1 de 1	
MODELO		All American SOX		TIPO DE MATERIAL			
				Estéril - Limpio			
FECHA			HORA	PRESION DE ESTERILIZACIÓN (PSI)	TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN (Min)	ANALISTA	OBSERVACIONES
D	M	A					
18	04	17	9:15	17 PSI	15 min	Rocio B.	
19	04	17	9:30	17 PSI	15 min	Rocio B.	
20	04	17	9:40	17 PSI	15 min	Rocio B.	
21	04	17	10:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
22	04	17	9:15	17 PSI	15 min	Rocio B.	
24	04	17	10:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
25	04	17	10:40	17 PSI	15 min	Rocio B.	
26	04	17	9:50	17 PSI	15 min	Rocio B.	
27	04	17	11:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
28	04	17	10:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
29	04	17	10:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
30	04	17	10:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
1	05	17	10:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
2	05	17	10:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
3	05	17	10:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
4	05	17	10:50	17 PSI	15 min	Rocio B.	
5	05	17	10:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
6	05	17	8:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
8	05	17	11:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
10	05	17	10:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
12	05	17	10:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
13	05	17	11:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
15	05	17	10:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	Ampolla Colision Confirme.
16	05	17	10:30	17 PSI	15 min	Rocio B.	
18	05	17	10:40	17 PSI	15 min	Rocio B.	
19	05	17	11:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	
20	05	17	10:00	17 PSI	15 min	Rocio B.	

Nota: Verificación eficacia esterilización ampolla Sterikon Frecuencia: Mensual  
 Laboratorio: MDS Pasteurizador

1 0



**ANEXO 6: Control de temperatura de refrigeración donde se conservaron las cepas de referencia**

