

**EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN INTERMEDIA DE LAS
TÉCNICAS DE PLACA PETRIFILM USADOS EN EL LABORATORIO DE
MICROBIOLÓGIA DE UNA PLANTA DE DERIVADOS CÁRNICOS.**

LIZETH KARIME MALDONADO CONTRERAS
Cód.: 1094275452

Informe De Pasantía Como Requisito Para Optar Al Título De Microbióloga

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
2019

**EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN INTERMEDIA DE LAS
TÉCNICAS DE PLACA PETRIFILM USADOS EN EL LABORATORIO DE
MICROBIOLÓGIA DE UNA PLANTA DE DERIVADOS CÁRNICOS.**

LIZETH KARIME MALDONADO CONTRERAS
Cód.: 1094275452

Informe De Pasantía Como Requisito Para Optar Al Título De Microbióloga

TUTOR LABORAL
Carol Rocío Buitrago Rozo
Ana María Rivera Barrios Nuevos

TUTOR ACADÉMICO
Ramón Ovidio García Rico Ph.D.
Doctor de Biología Molecular y Biotecnología- Microbiólogo.

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
2019

NOTA DE ACEPTACIÓN

TUTOR ACADÉMICO

JURADO

JURADO

PAMPLONA, 1 de agosto 2019

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION

1. OBJETIVOS.....	9
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	9
1.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	9
2. JUSTIFICACIÓN.....	10
3. MARCO REFERENCIAL.....	11
3.1 MARCO LEGAL.....	11
3.2 MARCO TEORICO	12
3.2.1 Antecedentes en la acreditación de laboratorio de ensayo.....	12
3.2.2 Origen de las normas de calidad y la acreditación de los laboratorios de ensayo.....	12
3.2.3 Validación de métodos.....	13
3.2.4 Métodos normalizados.....	14
3.2.5 Estudio de repetibilidad y reproducibilidad.....	15
3.2.6 Principio de los métodos.....	17
4. METODOLOGÍA.....	25
4.1 Ensayos de repetibilidad y precisión intermedia.....	25
4.2 Medios de cultivo empleados	26
4.3 Técnicas microbiológicas usadas	26
4.3.1 Recuento de bacterias aerobias mesófilas en placa petrifilm.....	26
4.3.2 Recuento de coliformes totales – E. coli en placa petrifilm	27
4.3.3 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en placa petrifilm	27
4.3.4 Recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) en placa petrifilm...28	
4.3.5 Recuento de Mohos y levaduras en placa petrifilm.....	28
4.4 Toma de datos	29
4.5 Cálculos estadísticos	29
5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	31
6. RESULTADOS Y ANALISIS.....	32
7. CONCLUSIONES.....	39
8. BIBLIOGRAFIA.....	40
9. ANEXOS.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Matrices utilizadas en la matriz de Repetibilidad y Precisión intermedia

Tabla 2: Medios de cultivos empleados, con la normativa de referencia y los criterios de aceptabilidad.

Tabla 3: Resultados obtenidos en UFC/mL en placa petrifilm para aerobios mesófilos.

Tabla 4: Cálculos estadísticos de ANOVA para los resultados en LOG de aerobios mesófilos.

Tabla 5: Resultados de ANOVA para Aerobios mesófilos.

Tabla 6: Resultados obtenidos en UFC/mL en placa petrifilm para Coliformes totales - E. coli.

Tabla 7: Cálculos estadísticos de ANOVA para los resultados en Log de Coliformes totales - E. coli.

Tabla 8: Resultados de ANOVA para Coliformes Totales - E. coli

Tabla 9: Resultados obtenidos en UFC/mL en placa petrifilm para S. aureus

Tabla 10: Cálculos estadísticos de ANOVA para los resultados en Log de S. aureus.

Tabla 11: Resultados de ANOVA para S. aureus.

Tabla 12: Resultados obtenidos en UFC/mL en placa petrifilm para Bacterias ácido lácticas.

Tabla 13: Cálculos estadísticos de ANOVA para los resultados en LOG de Bacterias Acido Lácticas.

Tabla 14: Resultados de ANOVA para Bacterias Acido Lácticas.

Tabla 15: Resultados obtenidos en UFC/mL en placa petrifilm para Mohos y levaduras.

Tabla 16: Cálculos estadísticos de ANOVA para los resultados en LOG de Mohos y levaduras.

Tabla 17: Resultados de ANOVA para Mohos y Levaduras

Tabla 18: Matriz de Repetibilidad y Precisión intermedia completa para Aerobios mesofilos.

Tabla 19: Matriz de Repetibilidad y Precisión intermedia completa para Coliformes totales - E.coli

Tabla 20: Matriz de Repetibilidad y Precisión intermedia completa para S. aureus.

Tabla 21: Matriz de Repetibilidad y Precisión intermedia completa para Bacterias ácido lácticas.

Tabla 22: Matriz de Repetibilidad y Precisión intermedia completa para Mohos y levaduras.

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1: Conceptos de precisión y exactitud.

Imagen 2: Parámetros de los métodos normalizados.

Imagen 3: Representación gráfica del concepto de repetibilidad.

Imagen 4: Representación gráfica del concepto de reproducibilidad.

Imagen 5: Principio de las técnicas de Placas petrifilm.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Definiciones

ANEXO 2. Archivo Excel FORMATO Matriz de Repetividad y precisión intermedia

INTRODUCCIÓN

Anteriormente los sistemas de medición eran evaluados solo considerando únicamente las características de la exactitud, estabilidad y linealidad, específicas de cada uno de los equipos, instrumentos o dispositivos que se usaban para cada proceso del método. Ya que estas propiedades solamente podían caracterizar el punto de las mediciones, debido a esto surgió la necesidad de incluir una evaluación de repetitividad y la Precisión intermedia como una herramienta para poder identificar la dispersión y la variabilidad de los resultados que se consiguen, que en la práctica es causada por el operador y/o el método empleado.

Las empresas encargadas de la producción y distribución de alimentos derivados cárnicos deben caracterizarse por elaborar productos de calidad e inocuos, ofreciendo al consumidor alimentos nutritivos y seguros para el consumo. A través de la práctica empresarial; específicamente en el laboratorio de microbiología se ponen en ejecución todos los conocimientos obtenidos a través de la formación universitaria y al mismo tiempo comprender y dominar los saberes, protocolos, metodologías y procedimientos empleados en un laboratorio de Microbiología en una planta productora de alimentos.

A través del laboratorio de microbiología y métodos de análisis es posible poseer una confiabilidad acerca de la calidad e inocuidad microbiológica sobre los alimentos que se producen, y así mediante los métodos de análisis y bajo la NTC 1325, aplicados a productos terminados, materias primas cárnicas y no cárnicas, manipuladores, agua potable, ambientes y superficies indicadores, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp; se asegura la calidad y la inocuidad de los alimentos que se producen y comercializan.

En el presente trabajo se da a conocer como un requisito que lo demanda la Resolución 1619 del 2015 por la cual se establece el Sistema de Gestión de la Red Nacional de Laboratorios en los ejes estratégicos de Vigilancia en Salud Pública y de Gestión de Calidad, Mediante la acreditación de laboratorios se comprueban diversos factores que describen la habilidad de los mismos para poder producir resultados de pruebas precisos y correctos a través de la validación de métodos analíticos. (Moroto, 1999) y según la ISO-17025 es imposible que un laboratorio compruebe su capacidad técnica para desarrollar una prueba si no realiza una validación de métodos analíticos de acuerdo a diversas guías, las cuales han sido aprobadas a nivel internacional.

En cuanto a los procesos que están involucrados en el desarrollo de los métodos utilizados y un informe estadístico donde se reportara la invalidez que se identifique por los analistas del laboratorio, los cuales son un factor determinante en la calidad y conformidad del producto. Adicionalmente se da a conocer la metodología que se empleara para la realización de los estudios de repetitividad y reproducibilidad que permita detectar la validez de los sistemas de medición y finalmente se darán a conocer los posibles resultados que se esperan con su desarrollo y se pretende, es plantear alternativas que permitan obtener mejoras en las prácticas de laboratorio de microbiología.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivos General

Evaluar la repetibilidad y precisión intermedia de las técnicas de placa petrifilm usados en el laboratorio de microbiología de una planta de derivados cárnicos.

1.2 Objetivos Específicos

- Determinar los parámetros microbiológicos que se analizan rutinariamente.
- Analizar el impacto que tiene el error de medición en el momento de realizar el ensayo.
- Evaluar las diferentes variables que inciden en los resultados obtenidos en este estudio.
- Establecer si la desviación estándar entre los resultados obtenidos por los analistas es significativa.

2. JUSTIFICACIÓN

El laboratorio de microbiología de una empresa productora de alimentos derivados cárnicos, se debe contar con un diagnóstico para la confiabilidad de los resultados obtenidos en los procedimientos realizados, cuya importancia del proyecto a realizar se ve soportada donde a través de la implementación de una herramienta estadística conocida como: Estudios de Repetitividad y Reproducibilidad consigue validar los criterios de las personas que toman decisiones para aceptar o rechazar un producto.

En determinados momentos la decisión de un analista del laboratorio de microbiología de rechazar productos que no cumplan con la calidad estipulada está ligada a factores subjetivos o de comportamientos dependientes. Dejar al azar esta toma de decisiones puede llevarnos a diversas situaciones.

El estudio R&R es una de las únicas herramientas que puede brindar la confianza de determinar el grado de criterios validos que un grupo de personas pueda tener para tomar las decisiones anteriormente mencionadas.

Por estas razones se realiza el presente proyecto; y con el fin de determinar el grado de variación de datos que se obtienen entre un analista u otro, obteniendo resultados confiables y si las competencias de las personas que toman decisiones están dependiendo de factores externos como su agudeza visual, una adecuada iluminación del sitio de trabajo o falta de entrenamiento en criterios.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 Marco Legal

El laboratorio de microbiología de una empresa productora de alimentos derivados cárnicos y el funcionamiento de sus procesos con resultados confiables; actualmente, se dirige y conduce bajo una serie de normativas conformadas por resoluciones, normas técnicas colombianas y normas ISO, cuyo propósito es reglamentar todos los aspectos y parámetros relacionados con el manejo de la exactitud y precisión que se obtiene en los resultados obtenidos, los sistemas de gestión de calidad ensayo y calibración de los laboratorios. Las cuales son las siguientes:

- Resolución 1619 del 15 de mayo de 2015, del Ministerio de Salud y Protección Social: Por la cual se establece el sistema de gestión de la red nacional de laboratorios en los ejes estratégicos de vigilancia en salud pública y gestión de calidad, que deben tener en cuenta para su funcionamiento los integrantes de dicha red.
- Norma Técnica Colombia NTC 1325-2008: la cual establece los requisitos que deben cumplir los productos cárnicos procesados no enlatados.
- Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025-2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración: A partir de esta norma internacional se establecen los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos, y/o calibraciones, incluido el muestreo. Cubre los ensayos y las calibraciones que se realizan utilizando métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos desarrollados por el propio laboratorio.
- La norma ISO 9001:2008 que “promueve la adopción de un enfoque basado en procesos cuando se desarrolla, implementa y mejora la eficacia de un sistema de gestión de la calidad, para aumentar la satisfacción del cliente mediante el cumplimiento de sus requisitos”.
- Norma Técnica Colombiana NTC 3529-6 de 1998: Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. parte 6: utilización en la práctica de los valores de exactitud
- Guía Técnica Colombiana GTC 131:2005: Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos y de los resultados de mediciones. guía práctica para el uso de la NTC 3529-2 (iso 5725-2) en el diseño, implementación y análisis estadístico de resultados.

- Decreto 1112-1996, por el cual se crea el sistema de información sobre medidas de normalización y procedimientos de evaluación de la conformidad.

3.2 Marco Teórico

3.2.1 Antecedentes en la acreditación de laboratorios de ensayo

La cooperación Internacional para la Acreditación de laboratorios (ILAC, international laboratory accreditation cooperatives) ha tenido un papel importante en el establecimiento de estándares internacionales para laboratorios de prueba. ILAC fue formalizada como un organismo de cooperación en 1996, cuando naciones firmaron en Ámsterdam un memorándum de entendimiento (MOU, memorandum of understanding). Tal acuerdo permite reforzar y facilitar la aceptación internacional de los resultados de las pruebas y la eliminación de técnicas comerciales. (ILAC, 2013).

La norma ISO 17025 establece los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos o de calibraciones, incluido el muestreo. Cubre los ensayos y calibraciones que se realizan utilizando métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos desarrollados por el propio laboratorio. Todo laboratorio de calibración/ensayo DEBE tener procedimientos de control de la calidad para realizar el seguimiento de la validez de los ensayos y las calibraciones llevados a cabo, uno de estos métodos es el estudio de Repetibilidad y Reproducibilidad.

3.2.2 Origen de las normas de calidad y la acreditación de los laboratorios de ensayo.

Las primeras normas de calidad estandarizadas publicadas oficialmente fueron creadas por los estadounidenses en el año de 1939 denominadas normas Z1 (ANSI/ASQC Z1.4), estas normas se enfocaron en la correcta elaboración de equipo militar (Cruz, 1999).

Una vez que los sistemas de calidad fueron iniciados por Estados Unidos, dichos sistemas fueron optados por los japoneses para sobrevivir económicamente, adquiriendo ambos países la capacidad de exportar productos manufacturados competentes a todo el mundo. Con el fin de aumentar sus niveles de competitividad, el resto de los países se vio obligado a crear sistemas normalizados de producción en cada uno de los diferentes sectores económicos existentes. (Juran, 1981).

En la etapa de creación de la ISO los laboratorios de pruebas y calibración jugaban un papel muy importante dentro de las organizaciones, dado que ya eran elementos de soporte para determinar o verificar las propiedades de los productos de acuerdo a

criterios establecidos, sin embargo, estos criterios no se encontraban internacionalmente respaldados (Pedroso, 2004).

En el año 1990, en Europa la ISO fue la responsable de generalizar los sistemas de acreditación de laboratorios basándose en la guía 25 ISO/IEC (Requerimientos para la competencia de calibración y pruebas de ensayo) y la norma europea EN 45001 (Criterios generales para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo) que se había usado hasta entonces solo por los institutos nacionales de metrología, en esta guía se establecían los requerimientos generales para realizar calibración y pruebas de laboratorios, uno de estos requerimientos comprendía la validación de métodos analíticos. (Cortez, 1999).

Hay que tener en cuenta que los métodos microbiológicos, aunque tengan el status de “métodos referencia” son basados en el conteo de unidades discretas y su incertidumbre tienen componentes aleatorios intrínsecos inevitables, imponderables que lo hacen elevar los valores de incertidumbres hasta valores más altos que de los métodos químicos en general (Boubetra et al - Appl Environ Microbiol (77):11, 2011).

Ensayos microbiológicos están, en general en la categoría de los que descartan el cálculo riguroso, metrológico y estadísticamente válido de la incertidumbre de mediciones. En general es apropiado basar la estimativa de la incertidumbre solamente en datos de repetitividad y reproducibilidad, pero de manera ideal, incluyendo la tendencia.

Los componentes individuales de la incertidumbre deben ser identificados y demostrado que están bajo control juntamente con evaluación de su contribución para la variabilidad de los resultados. Algunos de esos (pipeteo, pesaje, dilución) pueden ser prontamente medidos y evaluado que su contribución para la incertidumbre final es despreciable.

Por otro lado, otros (estabilidad de la preparación de la muestra) no pueden ser medidos directamente y su contribución no puede ser evaluada de manera estadística pero su importancia para la evaluación de los resultados debe ser considerada.

3.2.3 Validación de métodos

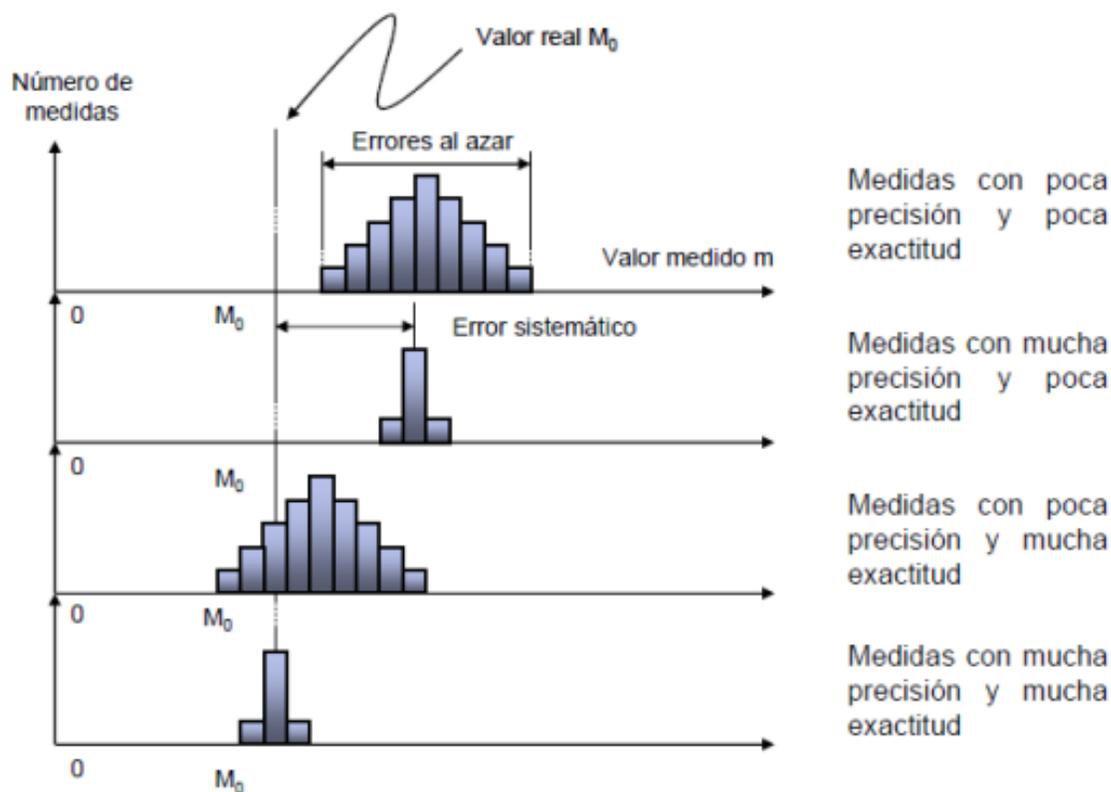
La validación de métodos consiste en un proceso de pruebas encaminadas a corroborar que un método es adecuado para un propósito en particular. Examina las características de desempeño de un método para establecer cualquier limitación que pueda esperarse del mismo cuando se aplica en un tipo específico de muestra (Eurachem, 2005).

Un ensayo es un medio por el cual se obtiene información específica de interés de diversas muestras a través de un análisis microbiológico, el cual antes de ser aplicado debe comprobar que cumple diversos requisitos que expongan la calidad de su aplicación, sus limitaciones y el efecto de estas en los resultados finales (Skoog, 2001).

La validación de métodos tiene como función dentro del sistema de aseguramiento de la calidad en un laboratorio confirmar tres elementos fundamentales: Que los instrumentos de medición sean adecuados y aptos para un correcto desempeño de los métodos analíticos, la buena formación del personal y la eficiente generación o confirmación de los procedimientos necesarios para cumplir con los objetivos específicos. (Cortez, 1999).

El resultado de una medición solo es un aproximado o estimado del valor convencional verdadero del mesurando; para conocer la calidad de las mediciones se realiza un análisis de los siguientes conceptos mediante la validación de métodos analíticos (Alamilla, 2005)

Imagen 1: Conceptos de precisión y exactitud (Eurachem, 2005)



3.2.4 Métodos normalizados

El Laboratorio utiliza un método normalizado que se aplica exactamente como está descrito en la norma. En este caso el laboratorio debe confirmar que puede aplicarlo correctamente previo a su uso en ensayos, mediante la comprobación del cumplimiento de los parámetros estadísticos que figuran en el método normalizado (siempre y cuando se indiquen en la norma).

Los parámetros a determinar son:

Imagen 2: Parámetros de los métodos normalizados.

Ensayos cualitativos	Ensayos cuantitativos
<ul style="list-style-type: none"> - Límite de detección - Verificación de la sensibilidad y la especificidad 	<ul style="list-style-type: none"> - Precisión (Repetibilidad + Precisión intermedia) - Límite de cuantificación ^(a) - Verificación de la veracidad

(a) El límite de cuantificación debe ser determinado en los casos que afecte o esté cercano al límite especificado en la norma correspondiente. Debe tenerse en cuenta que cualquier variación en el método normalizado implica la repetición de dicha confirmación.

3.2.5 Estudio de repetibilidad y reproducibilidad

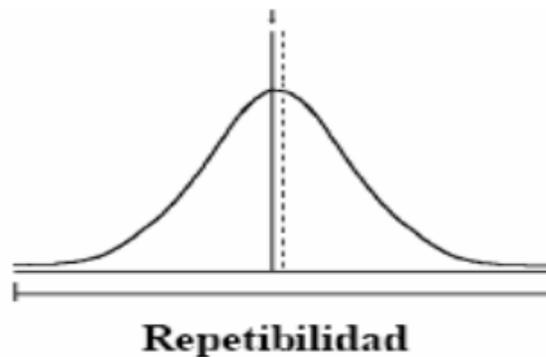
Entre las variables que se utilizan para definir la realidad de los procedimientos de medida se encuentran la repetibilidad (r) y la reproducibilidad (R). La repetibilidad se aplica a las medidas realizadas en condiciones lo más estables posible, tomadas con diferencias pequeñas de tiempo, por un mismo operario y con el mismo equipo (condiciones de repetibilidad). Por el contrario, la reproducibilidad se aplica a medidas hechas en distintas condiciones (distintos operarios, distintos aparatos, épocas diferentes). En este caso, para que una expresión de reproducibilidad sea válida, se deben especificar las condiciones en las que se realizan las mediciones. Según los expertos, los métodos estadísticos utilizados para la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad de las medidas se basan en la evaluación estadística de las dispersiones de los resultados, ya sea en forma de rango estadístico (máximo mínimo) o como varianzas y desviaciones estándar, pudiendo ser: rango, promedio y ANOVA (Bonnin y cols., 2012).

Se entiende por rango el método que permite una rápida aproximación a la variabilidad de las mediciones, pero no descompone la variabilidad en repetibilidad y reproducibilidad. Es útil como aproximación durante la etapa de estudios del potencial del proceso y no permite determinar, por separado, el error causado por el equipo y el operador. Por su parte, la relación entre el promedio y el rango es el método que posibilita una estimación tanto de la reproducibilidad como de la repetibilidad. Sin

embargo, no permite conocer su interacción entre r&R o entre instrumento y operador. Y, por último, el clásico test de ANOVA que, además de los componentes de la variación r&R, determina la significancia de la interacción entre las muestras y el operador y la variabilidad de las muestras (Bonnin y cols.,2012).

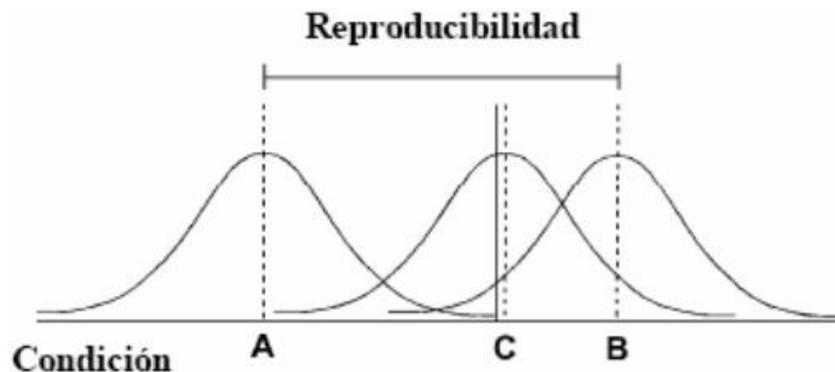
La repetibilidad puede ser expresada cuantitativamente en términos de la dispersión característica de los resultados. En la Figura 1 se muestra el concepto de repetibilidad.

Imagen 3: Representación gráfica del concepto de repetibilidad (Scientia et Technica, 2007)



Teniendo en cuenta que la reproducibilidad es la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo condiciones de medición que cambian, ésta se puede expresar en forma cuantitativa, en función de las características de la dispersión de los resultados; en la Figura 2 se observa una representación gráfica del concepto de reproducibilidad.

Imagen 4: Representación gráfica del concepto de reproducibilidad (Scientia et Technica, 2007)



Los métodos para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad de las mediciones están basados en la evaluación estadística de las dispersiones de los resultados, ya sea en forma de rango o su representación como varianzas o desviaciones estándar.

Los métodos que se utilizan son: Rango, Promedio y Rango, y ANOVA (análisis de varianza).

En el procedimiento que se orienta, la evaluación de repetibilidad en el proceso eso brinda una medida de la dispersión de la distribución de los resultados de la manufactura que introduce un operario utilizando una máquina varias veces para hacer un mismo tipo de pieza, usando un idéntico proceso de manufactura, en un ambiente estable y en intervalos cortos de tiempo. Por consiguiente, la repetibilidad será la variabilidad aleatoria de la producción de un operario por causa del equipamiento y derivadas de intentos sucesivos y bajo condiciones de fabricación definidas. El error de repetibilidad se considerará en el indicador variación del equipamiento (EV) y es una de las fuentes de error de los sistemas de manufactura que resulta de la variación o habilidad inherente de la máquina herramienta.

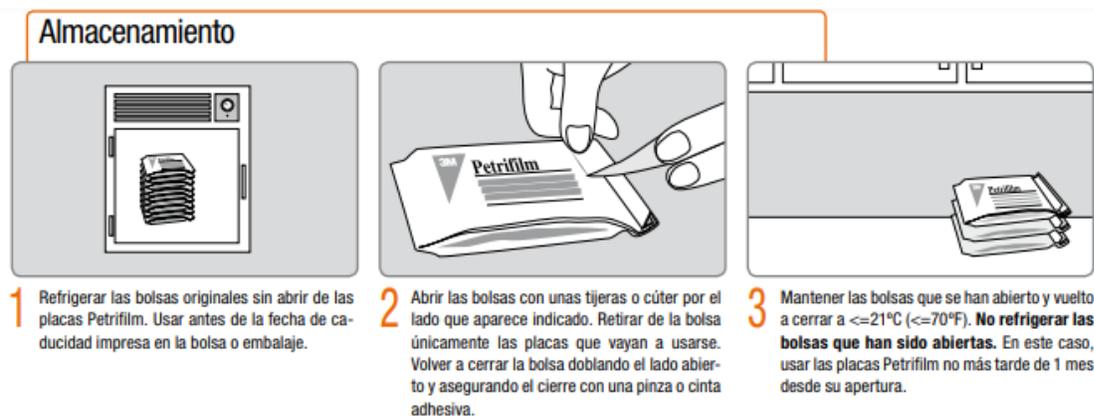
3.2.6 Principio de los métodos

Las placas 3M™ Petrifilm™ están diseñadas para satisfacer las necesidades científicas del sector alimentario de hoy.

El panorama de la seguridad alimentaria se encuentra en constante cambio. A diferencia de los métodos tradicionales con agar, las placas 3M™ Petrifilm™ están listas para usar. No es necesario prepararlas. Cada paquete compacto ofrece medios de prueba uniformes y consistentes.

Usar las placas es tan fácil como abrir el paquete y ponerse manos a la obra. Aproveche la libertad de poder dedicar el tiempo a centrarse en lo que realmente importa: la calidad y la eficiencia. Ha llegado la hora de dar un nuevo giro a la seguridad alimentaria.

Imagen 5: Principio de las técnicas de Placas petrifilm (Ciencia© 3M, 2017)



Preparación de Muestra



4 Preparar una dilución de la muestra de alimento 1:10 o superior. Pesar o pipetear la muestra en una bolsa Whirlpac, bolsa Stomacher, botella de dilución o cualquier otro recipiente estéril apropiado.

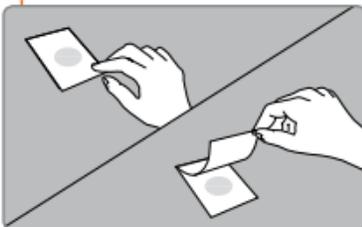


5 Añadir el diluyente apropiado. Usar diluyentes estándar tales como tampón fosfato, agua de peptona, tampón de Butterfield, solución Ringer, peptona-sal, agua destilada y otros. No usar tampones que contengan citrato de sodio o tiosulfato.

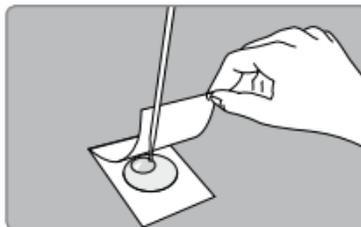


6 Mezclar u homogeneizar la muestra mediante los métodos usuales

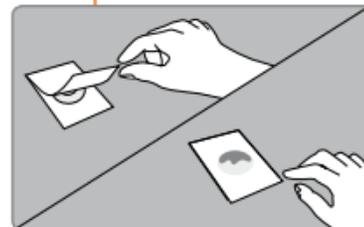
Siembra



7 Disponer la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior.

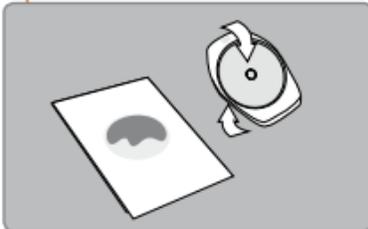


8 Pipetear 1 ml de muestra al centro aproximadamente del film inferior. Mantener la pipeta en posición vertical. No tocar el film inferior mientras se pipetea.

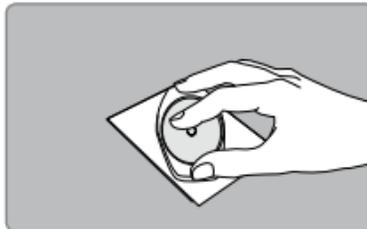


9 Soltar el film superior y dejarlo caer. No deslizar el film hacia abajo.

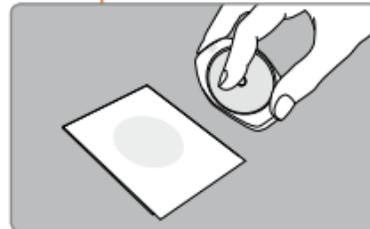
Siembra



10 Colocar el aplicador en el film superior bien centrado sobre el inóculo. Usar el aplicador con la cara rebajada hacia abajo (cara lisa hacia arriba).

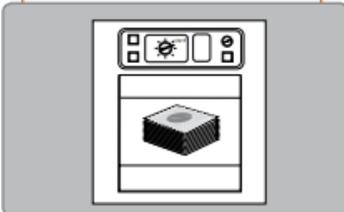


11 Aplicar presión de manera suave sobre el aplicador para distribuir el inóculo por toda la zona circular. **No mover ni girar el aplicador.**



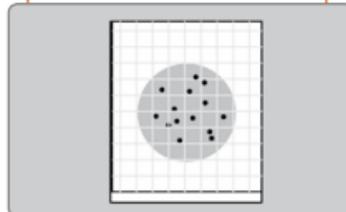
12 Levantar el aplicador. Esperar 1 minuto para que se solidifique el gel.

Incubación



13 Incubar las placas Petrifilm cara arriba y apiladas en grupos de no más de 20 placas. Incubar a 30 +/-1°C durante 72 +/-2 horas para cualquier tipo de alimento. Consultar otras condiciones particulares de incubación.

Interpretación



14 Leer las placas. Usar un lector de placas 3M™ Petrifilm™, contador de colonias estándar Quebec u otros. No usar luz de fondo para la lectura de esta placa, usar luz directa. Consultar la Guía de Interpretación para leer los resultados.

- **Escherichia coli**

Escherichia coli es una bacteria común que se encuentra en los intestinos de animales y personas. Se trata de bacilos Gram negativos anaerobios facultativos, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, motil por flagelos peritricos con dimensiones de 0.5 x 1.9 a 3.0 micras, no esporulada. Su bioquímica típica consiste en la fermentación de la glucosa y la lactosa, así como, positiva al indol, descarboxilación de lisina, fermenta el manitol produciendo gas a partir de la glucosa, y es citrato negativo. Este bacilo cumple un papel muy importante en el correcto funcionamiento del proceso digestivo y está relacionado con la producción de vitaminas B y K. En la mayoría de los casos E. coli se encuentra en los intestinos humanos sanos; sin embargo, algunos serotipos pueden causar diarrea y otras enfermedades sistémicas (Puentes y Dustan, 2018).

La clasificación los grupos de Escherichia coli causantes de diarrea se basa en las diferencias antigénicas y el mecanismo de patogenicidad, dividiéndose en 6 grupos: Escherichia coli enteroagregativa (EAEC), Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC), Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC), Escherichia coli enteropatógena (EPEC), Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC), y Escherichia coli difusamente adherente (DAEC). El serotipo con mayor prevalencia relacionado con alteraciones intestinales es la ETEC estos casos ocurren particularmente en sectores desprotegidos, y las personas que viajan a esas áreas, por esta razón también es llamada la diarrea del viajero (Mirhoseinia, Amania, y Naza, 2018).

El 3M Petrifilm Rapid E. coli / Coliform Count Plate

Es un sistema autocontenido de muestra, listo para el cultivo, que contiene un agente gelificante soluble en agua fría y dos indicadores diferentes; 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-glucuronido que indica la actividad de la glucuronidasa y el tetrazolio que facilita la enumeración de colonias. El 3M Petrifilm Rapid E. coli / Coliform Count Plate está diseñado para el uso para la enumeración de E. coli y coliformes en diversos productos de alimentos y bebidas y de superficies ambientales. La morfología típica de la colonia para E. coli es de azul a azul-verde con o sin producción de gas, independientemente de su tamaño o intensidad de color. Otros aislamientos de coliformes aparecerán como colonias rojas con gas atrapado (dentro de aproximadamente un diámetro de colonia). El rango cuantitativo exacto es menor o igual a 100 CFU por placa para el recuento total de coliformes, y menor o igual a 100 azul a azul-verde CFU por placa para el recuento de E. coli.

Los estudios realizados en esta evaluación muestran que los resultados de la placa de recuento de E. coli / coliforme 3M Petrifilm Rapid no fueron estadísticamente diferentes cuando se compararon con los BAM Ch. 4, ISO 4832: 2006 e ISO 16649-2: 2001 para la enumeración de E. coli y coliformes totales.

Las pruebas de robustez demostraron que el rendimiento de la placa de recuento de E. coli / coliforme Petrifilm Rapid de 3M no se vio afectado negativamente por pequeñas variaciones en los parámetros clave (volumen de la muestra y tiempo de incubación), por lo que puede ocurrir durante el uso rutinario del laboratorio.

El 3M Petrifilm Rapid E. coli / Coliform Count Plate ofrece la capacidad de no solo detectar sino también enumerar colonias de coliformes y E. coli en tan solo 18 h. Permite una fácil visibilidad y diferenciación de colonias de E. coli y coliformes en una sola placa, mientras que el método FDA requiere una diferenciación visible por parte de expertos y los métodos ISO requieren dos formulaciones y procedimientos de medios diferentes. El tamaño pequeño y apilable de la placa 3C Petrifilm Rapid E. coli / Coliform es una ventaja si el espacio es un factor para laboratorios específicos.

- **Aerobios mesófilos**

Son todas aquellas bacterias aerobias, mesófilas capaces de crecer en agar nutritivo. Se investigan por el método de recuento en placa con siembra en profundidad, que se basa en contar el número de colonias desarrolladas en una placa de medio de cultivo sólido (Agar para recuento en placa o PCA), donde se ha sembrado un volumen conocido de la solución madre o sus diluciones (1 ml) , incubadas a 37° C durante 24 hs. El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, en condiciones establecidas, estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos.

Refleja la calidad sanitaria de los productos analizados, indicando además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración. Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. Ahora bien, salvo en alimentos obtenidos por fermentación, no son recomendables recuentos elevados.

La placa 3M™ Petrifilm™ Rapid Aerobic Count (RAC)

Es un sistema de medio de cultivo listo para muestra. Las placas 3M™ Petrifilm™ Rapid Aerobic Count contienen nutrientes, un agente gelificante soluble en agua fría y una tecnología de indicador de doble sensor que facilita la enumeración de

colonias en 24 horas para la mayoría de las matrices de alimentos. Las placas 3M Petrifilm RAC se utilizan para la enumeración de bacterias aeróbicas en las industrias de alimentos y bebidas.

La placa 3M Petrifilm RAC ha sido validada utilizando muestras representativas de las siguientes matrices: carne molida cruda, carne de cerdo cruda molida, enjuague de la canal de pollo, salchicha de pavo cruda, swai fresco, atún fresco, camarón tigre fresco, camarón de fácil pelado, lavado de tomate cherry, arándanos congelados, albaricoques mediterráneos, aderezo cremoso para ensaladas, pasta fresca, helado de vainilla, leche en polvo seca y leche desnatada pasteurizada (AOAC, Petrifilm™ Rapid Aerobic Count Plate).

El 3M™ Petrifilm™ RAC demostró la confiabilidad como una alternativa rápida y precisa a los métodos de referencia para la enumeración de placas aeróbicas en los productos alimenticios evaluados en ambos estudios (Jechorek. R.P (RAC Plate)).

- **Staphylococcus aureus**

La familia Staphylococcaceae comprende cuatro géneros, de ellos el más importante clínicamente es el género Staphylococcus. Los miembros de este género son Gram positivos, anaerobios facultativos, inmóviles, que habitualmente forman agrupaciones de forma irregulares o racimos de uva, su bioquímica consiste en catalasa positivos, oxidasa negativos, fermentan la glucosa y poseen ácido teicóico en sus paredes celulares. Staphylococcus aureus es un patógeno facultativo que se encuentra colonizando las áreas nasofaríngeas, piel y membranas mucosas de personas sanas portadoras que varía en 20% a 30%, a su vez causa infecciones invasivas graves. S. aureus puede causar infecciones endógenas, entre estas enfermedades invasivas agudas, como infecciones de la piel, tejidos blandos, endocarditis, sepsis, entre otros. Se conoce una actual diseminación de S. aureus resistente a meticilina (SARM), estas infecciones pueden tener posibilidades de tratamiento limitadas. No obstante, las cepas de S. aureus susceptibles a meticilina (MSSA) no deben subestimarse como patógenos inofensivos, estas pueden causar infecciones piógenas de igual severidad (Deinhardt et al., 2018).

En Estados Unidos y países industrializados S. aureus se considera una de las causas más destacadas generando infecciones bacterianas. Entre los años 1998 a 2005 S. aureus fue la bacteria con mayor frecuencia recuperada a partir de pacientes hospitalizados entre 300 laboratorios clínicos de Estados Unidos. También fue el segundo de los aislamientos con mayor recuperación después de E. coli generando bacteriemias en Europa hacia el año 2008. Fuentes recientes

informan que *S. aureus* es el segundo patógeno asociado a infecciones en los Estados Unidos después de *Clostridium difficile* (Kobayashi, Malachowa, & DeLeo, 2015). *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico de una amplia gama de infecciones, intoxicaciones alimentarias y síndrome de shock tóxico. Esta variedad de enfermedades está estrechamente ligada con los factores de virulencia, entre los que resaltan antígenos patógenos presentes en las células bacterianas, enzimas y toxinas, tales como enterotoxinas estafilocócicas (EE y SE) siendo importantes en los brotes por intoxicaciones (Hu, Wang, Fang, Okamura, & Ono, 2018).

El recuento 3M™ Petrifilm™ Staph Express (STX)

Consiste en una placa de recuento Petrifilm Staph Express y un disco Petrifilm Staph Express, que están empaquetados por separado. La placa de recuento Petrifilm Staph Express es un sistema de medio de cultivo preparado que contiene un agente gelificante soluble en agua fría. El medio cromogénico de Baird-Parker modificado de la placa es selectivo y diferencial para el *Staphylococcus aureus* pero también puede indicar el *S. hyicus* o *S. intermedius*. El disco Petrifilm Staph Express contiene azul-O toluidina que facilita la visualización de las reacciones de la desoxirribonucleasa (DNasa). Los organismos DNasa-positivos detectados en la placa Petrifilm Staph Express incluyen el *Staphylococcus*. Las placas y discos Petrifilm Staph Express se utilizan para la enumeración de especies de *Staphylococcus* DNasa positivas en las industrias de alimentos y de bebidas.

- **Bacterias Acido Lacticas (BAL)**

Las BAL son un conjunto de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, en forma de cocos o bastones y catalasa negativa (aunque en algunos casos pueden encontrarse una pseudo-catalasa), con un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como el mayor producto final de la fermentación de los azúcares vía Embden-Meyer –glucólisis-) y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO₂ por la vía del ácido-6-fosfogluconico (heterofermentación) (Lyhs, 2002; Larpent, 1995a). En términos generales estas bacterias tienen complejas necesidades de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas. Esta es una de las razones del porqué abundan en un medio tan rico nutricionalmente como la leche. A nivel de laboratorio se deben emplear medios selectivos que posean estas características para su aislamiento (por ej., el caldo o agar MRS, agar Rogosa). Otra característica de este grupo de bacterias es su tolerancia al pH ácido (pH = 5, incluso a veces menores), Pero conforme el medio se va acidificando, resultan inhibidas un mayor número de especies

El 3M Petrifilm Lactic Acid Bacteria Count Plate

Es un sistema autónomo, preparado para el cultivo de muestras, que contiene nutrientes, agentes selectivos, un agente gelificante soluble en agua y un indicador de tetrazolium que facilita la enumeración de colonias. La placa contiene compuestos de captación de oxígeno que crean un ambiente anaeróbico para la recuperación de bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas en las industrias de alimentos y bebidas.

Las bacterias de ácido láctico homofermentativas producen principalmente ácido láctico, mientras que las bacterias de ácido láctico hetero-fermentativas producen gas además del ácido láctico. En la placa de recuento de bacterias del ácido láctico Petrifilm 3M, las bacterias del ácido láctico homofermentativas aparecen como colonias rojas sin gas; Las colonias heterofermentativas aparecen como colonias rojas con una burbuja de gas asociada. Cuando las placas de muestra se incuban durante 48 ± 3 ha 28°C a 37°C , las bacterias del ácido láctico aparecerán como colonias rojas con o sin producción de gas. El rango cuantitativo exacto para las bacterias del ácido láctico es menos de 150 CFU por prueba para las colonias con producción de gas o menos de 300 CFU por prueba para las colonias cuando no hay producción de gas presente).

El método candidato ofrece la capacidad de no solo detectar, sino también enumerar colonias de bacterias del ácido láctico en tan solo 45 h usando incubación aeróbica, mientras que el método de referencia ISO requiere hasta 75 h para detectar la presencia de bacterias del ácido láctico y el método CMMEF requiere anaeróbica incubación. El tamaño pequeño y apilable de la placa de recuento de bacterias del ácido láctico petrifilm 3M se ha demostrado como una ventaja si el espacio es un factor para laboratorios específicos.

- **Mohos y levaduras**

Según Tortajada et al. (2001), las micotoxinas son sustancias nocivas para la salud, generadas por el crecimiento de hongos que contaminan los alimentos, la presencia de estas toxinas implican la posible existencia de otras debido a que un solo hongo produce diferentes micotoxinas.

Entre los hongos toxigénicos destaca el género *Aspergillus* con dos variedades, el *A. flavus* y el *A. parasiticus*, por generar las aflatoxinas que son potentes hepatocarcinógenos. El *A. flavus* produce aflatoxinas B1 y B2, mientras que el *A. parasiticus* produce aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, las cuales son tóxicas y cancerígenas.

Las micotoxinas del género *Fusarium* están relacionadas con el cáncer del esófago en los humanos. La ocratoxina C producida por el *A. ochraceus* y por el *Penicillium verrucosum*, está implicada con la tumorigénesis de las vías urinarias (Tortajada et al., 2001).

Según Pelczar y Reid (1966), muchas levaduras relacionadas con los animales de sangre caliente no son patógenas, o por lo menos lo son ligeramente. Normalmente las bacterias del tracto intestinal las mantienen reprimidas. Cuando un organismo es sometido a tratamientos con antibióticos, las levaduras pueden proliferar libremente y causar infecciones que pueden adoptar forma de enfermedades de la piel (*Candida albicans*) que puede dar origen a infecciones generalizadas de bronquios y pulmones. El *Cryptococcus neoformans* causa una infección sistémica grave que afecta al cerebro y meninges. Es importante mencionar que estas levaduras no se adquieren a través de los alimentos.

La placa 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count (RYM)

Es un sistema de medio de cultivo listo para la muestra que contiene nutrientes suplementados con antibióticos, un agente gelificante soluble en agua fría y un sistema indicador que facilita la enumeración de mohos y levaduras, pero no distingue entre sí el moho de levadura. 3M Petrifilm RYM se utiliza para la enumeración de levadura y moho en las industrias de alimentos y bebidas, y se ha validado para yogur, crema agria, almendras, manzanas rebanadas, masa de pan congelada, pastel listo para hornear, emparedados, sopa deshidratada, salami fermentado y empanadas de carne molida congelada.

El método 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast y Mold Count Plate se comparó con los métodos de referencia ISO 21527: 2008 partes 1 y 2 y FDA BAM Capítulo 18 a las 48 y 60 horas para la detección y enumeración de levadura y moho de una variedad de los alimentos. Diez matrices de alimentos (yogur, crema agria, almendras, manzanas rebanadas, masa de pan congelada, pastel ya preparado, sándwiches, sopa deshidratada, salami fermentado y empanadas de carne molida congelada) se inocularon con coliformes en niveles bajos, medios y altos. Los recuentos de registros del método 3M Petrifilm RYM Plate se compararon con los registros de registros de los métodos de referencia.

Se demostró la resistencia del método para tres parámetros de prueba, incluida la temperatura de incubación, el tiempo de incubación y el agua para la rehidratación. Resumen de las reclamaciones de rendimiento validadas (Jechorek. R.P (RYM Plate)).

4 METODOLOGÍA

El propósito de los estudios Repetibilidad y Precisión intermedia es verificar la variabilidad del sistema evaluado, sea insignificante con respecto a la variación del producto que se controla en sus parámetros de calidad.

Tomándose un total de 10 muestras donde se obtuvieron con 10 matrices tabla 1 (estas matrices son tomadas por que ya había expirado la fecha de vencimiento y porque también había dado un recuento alto en los análisis hechos internamente en el laboratorio) en las cuales participaron 3 analistas las cuales denominaremos AM, LM, CB donde cada una de ellas realizo ensayo con diferentes matrices como el de repetibilidad que el analista AM y el LM lo realizaron 3 veces el analista CB lo realizo 4 veces. Y para el de Precisión intermedia el analista CB y el LM lo realizaron 3 veces y el analista AM lo realizo 4 veces.

4.1 Ensayos de repetibilidad y precisión intermedia:

Se analizó 10 muestras (ver tabla 1) de distintos tipos de carnes (pasta de pollo, recorte de cerdo) y productos cárnicos (salchicha, Hamburguesa, salchichón y practicarne), estas fueron analizadas por dos analistas diferentes, teniendo la misma matriz bajo condiciones iguales, donde uno de ellos realiza la misma prueba por duplicado para determinar el valor de repetibilidad donde lo nombraremos como duplicado 1 (D1) y duplicado 2 (D2) y el otro analista realiza el mismo ensayo solo una vez donde se denominará duplicado 3 (D3) para determinar la Precisión intermedia.

Donde cada una de ellas es sembrada en medio de cultivo específico para el crecimiento óptimo de los microorganismos ya que se encontraban listas las matrices para realizar la siembra directa en el medio de cultivo.

Tabla 1: Matrices utilizadas en la matriz de Repetibilidad y Precisión intermedia

La matriz 1	Salchichas RICA x 500g
La matriz 2	Pasta de pollo
La matriz 3	Recorte de cerdo 90/10
La matriz 4	Paleta Cushion
La matriz 5	Hamburguesa Pre asada RANCHERA x 400g
La matriz 6	Recorte 80/20
La matriz 7	Pollo MDM Nacional
La matriz 8	Hamburguesa de cerdo congelada x 1 Kg
La matriz 9	Salchichón cervecero CUNIT x 700g
La matriz 10	Practicarne ZENU x 200g

Seguidamente se realizó un conteo de las placas anotando los resultados, posteriormente se efectuó una transformación de los resultados obtenidos en Log₁₀, recurso matemático en que supone que la distribución de los microorganismos en la

muestra es una distribución normal, seguidamente se efectuó la comparación de los resultados.

4.2 Medios de cultivo empleados:

Tabla 2: Medios de cultivos empleados, con la normativa de referencia y los criterios de aceptabilidad.

	Medios de cultivo empleados	Norma de referencia	Criterios de aceptabilidad	
			Repetibilidad	Precisión intermedia
1	El 3M™ Petrifilm™ Rapid Aerobic Count (AC)	AOAC 990.12	0.278	0.348
2	El 3M™ Petrifilm™ Rapid E. coli / Coliform Count Plate	AOAC 998.08	0.257	0.391
3	El 3M™ Petrifilm™ Staph Express (STX)	AOAC 2003.07	0.27	0.75
4	El 3M™ Petrifilm™ Lactic Acid Bacteria Count Plate	AOAC 041701	0.141	0.25
5	El 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count	AOAC 2014.05	0.36	0.37

4.3 Las técnicas microbiológicas utilizadas fueron:

4.3.1 Recuento de bacterias aerobias mesófilas totales en placa de petrifilm: (ICMSF, 1982)

Se pesaron 10 g de la muestra de carne o producto cárnico o no cárnico en forma aséptica y se diluyeron en 90 ml de agua peptonada al 0,1% (dilución 10-1). Se homogenizó en Stomaker. Se realizaron diluciones decimales en tubos con 9 ml de agua peptonada al 0,1%.

Se colocar la placa Petrifilm Rapid Aerobic Count en una superficie plana y nivelada y con la pipeta perpendicular a la placa tomar 1 ml de las diluciones a trabajar y depositar el líquido en el centro de la película una vez levantada la película superior.

Dejar caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formen burbujas. Colocar suavemente el dispersor sobre la parte central de la placa donde se encuentra la muestra y hacer presión.

Esperar aproximadamente 2 minutos para que se solidifique el gel e incubar a 35 +/- 2°C por 48 horas.

El resultado se calculó realizando el recuento en la placa que presentó y multiplicando por el factor de dilución y expresando el resultado en unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g).

4.3.2 Recuento de coliformes totales en placa de petrifilm: (ICMSF, 1982)

Se pesaron 10 g de la muestra de carne o producto cárnico en forma aséptica y se diluyeron en 90 ml de agua peptonada al 0,1% (dilución 10-1). Se homogenizó en Stomaker. Se realizaron diluciones decimales en tubos con 9 ml de agua peptonada al 0,1%.

Se colocar la placa Petrifilm Rapid E. coli / Coliform Count Plate en una superficie plana y nivelada y con la pipeta perpendicular a la placa tomar 1 ml de las diluciones a trabajar y depositar el líquido en el centro de la película una vez levantada la película superior.

Dejar caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formen burbujas. Esta placa no se utiliza el dispersor.

Esperar aproximadamente 2 minutos para que se solidifique el gel e incubar a 35 +/- 2°C por 48 horas.

El resultado se calculó realizando el recuento en la placa que presentó de colonias típicas (colonias rojas, lactosa positiva y colonias azules, lactosa positiva) multiplicando por el factor de dilución y expresando el resultado en unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g).

4.3.3 Recuento de Staphylococcus aureus en placa de petrifilm: (ICMSF, 1982)

Se pesaron 10 g de la muestra de carne o producto cárnico en forma aséptica y se diluyeron en 90 ml de agua peptonada al 0,1% (dilución 10-1). Se homogenizó en Stomaker. Se realizaron diluciones decimales en tubos con 9 ml de agua peptonada al 0,1% según lo requiera la muestra.

Se colocar la placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada y con la pipeta perpendicular a la placa tomar 1 ml de las diluciones a trabajar y depositar el líquido en el centro de la película una vez levantada la película superior.

Dejar caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formen burbujas.

Colocar suavemente el dispersor sobre la parte central de la placa donde se encuentra la muestra y hacer presión.

Esperar aproximadamente 2 minutos para que se solidifique el gel e incubar a 35 +/- 2°C por 48 horas.

El resultado se calculó realizando el recuento en la placa que presentó de colonias típicas (rojo-violeta) multiplicando por el factor de dilución y expresando el resultado en unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g).

4.3.4 Recuento de Bacterias ácido lácticas en placa de petrifilm: (ICMSF, 1982)

Se pesaron 10 g de la muestra de carne o producto cárnico en forma aséptica y se diluyeron en 90 ml de agua peptonada al 0,1% (dilución 10-1). Se homogenizó en Stomaker. Se realizaron diluciones decimales en tubos con 9 ml de agua peptonada al 0,1%.

Se colocar la placa Petrifilm Lactic Acid Bacteria Count Plate en una superficie plana y nivelada y con la pipeta perpendicular a la placa tomar 1 ml de las diluciones a trabajar y depositar el líquido en el centro de la película una vez levantada la película superior.

Dejar caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formen burbujas. Colocar suavemente el dispersor sobre la parte central de la placa donde se encuentra la muestra y hacer presión.

Esperar aproximadamente 2 minutos para que se solidifique el gel e incubar a 35 +/- 2°C por 48 horas.

El resultado se calculó realizando el recuento en la placa que presentó de colonias típicas (tienen una forma irregular y no están relacionadas con una colonia roja) multiplicando por el factor de dilución y expresando el resultado en unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g).

4.3.5 Recuento de Mohos y Levaduras en placa de petrifilm: (ICMSF, 1982)

Se pesaron 10 g de la muestra de carne o producto cárnico en forma aséptica y se diluyeron en 90 ml de agua peptonada al 0,1% (dilución 10-1). Se homogenizó en Stomaker. Se realizaron diluciones decimales en tubos con 9 ml de agua peptonada al 0,1%.

Se colocar la placa Petrifilm Rapid Yeast and Mold Count Plate en una superficie plana y nivelada y con la pipeta perpendicular a la placa tomar 1 ml de las diluciones a

trabajar y depositar el líquido en el centro de la película una vez levantada la película superior.

Dejar caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formen burbujas. Colocar suavemente el dispersor sobre la parte central de la placa donde se encuentra la muestra y hacer presión.

Esperar aproximadamente 2 minutos para que se solidifique el gel e incubar a 25 +/- 2°C por 72 horas.

El resultado se calculó realizando el recuento en la placa que presentó de colonias típicas de levaduras (pequeñas, bordes definidos, color canela rosado a verde azulado y tienen un color uniforme) y los mohos (grandes, bordes difusos, color verde azulado después de una incubación prolongada) multiplicando por el factor de dilución y expresando el resultado en unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g).

4.4 Toma de datos.

Como en cualquier análisis estadístico, mientras mayor sea el tamaño de la muestra mejores serán los resultados obtenidos del estudio, pero en análisis de procesos de manufactura, una muestra grande con participación de gran cantidad de personal e insumos puede hacer muy costoso la aplicación del procedimiento, por consiguiente, para la planeación y preparación suficiente.

Se realizó un formato en Excel para adjuntar o registrar los datos obtenidos en las pruebas por los analistas, por cada una de los ensayos los cuales tiene criterios de aceptabilidad los cuales están estipulados en la norma de referencia AOAC, con los que se determinó la repetibilidad y reproducibilidad o precisión intermedia de cada una de las matrices analizadas.

4.5 Cálculos estadísticos

Cada analista realizara ensayos rutinarios del laboratorio como es la técnica de siembra en placa Petrifilm, serán registrados los resultados obtenidos de los métodos realizados por cada analista. Los datos obtenidos son organizados en una tabla para cada microorganismo.

Para efectuar el análisis estadístico los resultados obtenidos se expresaron en log₁₀ ufc/mL. Se utilizó el análisis de varianza con el test de ANOVA, usando el programa OriginPro 8.0, con el objetivo de determinar si hay diferencias significativas en los resultados hallados en los ensayos de reproducibilidad con un porcentaje de confiabilidad del 95%.

Al programa OriginPro 8.0 se agregan los valores que fueron transformados en LOG₁₀. Donde cada uno de estos es agregó manualmente y seguidamente seleccionas los

datos y elijes la función que quieres obtener (ANALISIS DE ANOVA). El Programa ejecuta las operaciones y nos arroja los resultados que le pedimos del análisis.

Ecuaciones:

$Ln = \text{Log. } Dn$

Donde

Ln: Resultado expresado en LOG

Dn: Resultado obtenido por el analista

$|r1 - r2|$

Donde

r1: Resultado del analista expresado en Log (L1)

r2: Resultado del analista expresado en Log (L2)

$|r1 - r3|$

Donde

r1: Resultado del analista expresado en Log (L1)

r2: Resultado del analista expresado en Log (L3)

TEST r (Repetibilidad)

$SI((r1-r2) \leq N; "VÁLIDO"; "NO VÁLIDO")$

Donde

SI: Prueba si se cumple una condición

r1: Resultado del analista expresado en Log (L1)

r2: Resultado del analista expresado en Log (L2)

N: Criterio de aceptabilidad para la Repetibilidad según la AOAC para cada técnica

TEST R (Precisión intermedia)

$SI((r1-r3) \leq N; "VÁLIDO"; "NO VÁLIDO")$

Donde

SI: Prueba si se cumple una condición

r1: Resultado del analista expresado en Log (L1)

r3: Resultado del analista expresado en Log (L3)

N: Criterio de aceptabilidad para la Precisión intermedia según la AOAC para cada técnica

5 CRONOGRAMA

ACTIVIDADES	ABRIL				MAYO				JUNIO				JULIO			
	Semanas				Semanas				Semanas				Semanas			
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Inducción al laboratorio de Microbiología																
Preparación de material y medios de cultivo																
Diligenciamiento de formatos control de calidad de autoclaves, control de preparación de medios de cultivo																
Análisis microbiológico de agua potable																
Análisis microbiológico de producto terminado, materias primas cárnicas y no cárnicas.																
Análisis microbiológico de Patógenos en equipo VIDAS																
Análisis microbiológico de Superficies																
Análisis Microbiológico de ambientes																
Análisis microbiológico superficies <i>Listeria</i> e indicadores																
Análisis microbiológico de estabilidades y seguimientos																
Análisis microbiológico de manipuladores																
Controles internos del Laboratorio																
Antibióticos																
Revisión y desarrollo para la realización y continuación del cepario																
Interlaboratorio																
Matriz de repetitividad y reproducibilidad																
Activación de cepas																
Revisión bibliográfica																
Control de Calidad Métodos de Análisis y medios de Cultivo																
Desarrollo trabajo escrito																

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se pueden evidenciar en la tabla 3, 6, 9 12, 15 de los resultados obtenidos en las placas de petrifilm (Aerobios mesófilos, coliformes totales-*E. coli*, *S. aureus*, Bacterias ácido lácticas y Mohos y levaduras) donde son comparados con los valores de aceptabilidad para aerobios mesófilos la Repetibilidad: 0.27 y la Precisión intermedia 0.348, Coliformes totales y *E. coli* la Repetibilidad: 0.257 y la Precisión intermedia 0.391, *S. aureus* la Repetibilidad:0.27 y la Precisión intermedia 0.75, Bacterias ácido lácticas (BAL) la Repetibilidad: 0.141 y la Precisión intermedia 0.25 y Mohos y levaduras la Repetibilidad: 0.36 y la Precisión intermedia 0.37. Se realizó un conteo en placas de petrifilm de microorganismos viables, es decir, microorganismos que tienen la capacidad de reproducirse.

Tabla 3: Resultados obtenidos en UFC/mL en placa petrifilm para aerobios mesófilos

Matriz	Duplica do 1 = D1	Duplica do 2 = D2	Duplica do 3 = D3	L1=Log. D1	L2=Log. D2	L3=Log. D3	Valor r1 - r2	Valor r1 - r3	TEST r	TEST R
1	19500	10100	13500	4,0	4,3	4,1	0,29	0,16	NO VÁLIDO	VÁLIDO
2	9000	9200	8900	4,0	4,0	3,9	0,01	0,00	VÁLIDO	VÁLIDO
3	500	300	700	2,7	2,5	2,8	0,22	0,15	VÁLIDO	VÁLIDO
4	2000	3000	4000	3,3	3,5	3,6	0,18	0,30	VÁLIDO	VÁLIDO
5	300000	330000	310000	5,5	5,5	5,5	0,04	0,01	VÁLIDO	VÁLIDO
6	250000	270000	250000	5,4	5,4	5,4	0,03	0,00	VÁLIDO	VÁLIDO
7	900	900	1000	3,0	3,0	3,0	0,00	0,05	VÁLIDO	VÁLIDO
8	7800	8000	8200	3,9	3,9	3,9	0,01	0,02	VÁLIDO	VÁLIDO
9	250	280	350	2,4	2,4	2,5	0,05	0,15	VÁLIDO	VÁLIDO
10	80000	90000	80000	4,9	5,0	4,9	0,05	0,00	VÁLIDO	VÁLIDO

Como se observa en la tabla 3 los resultados obtenidos por los analistas que realizan la prueba con cada matriz donde D1 y D2 son de un analista y D3 es del otro analista u operador las cuales están en unidades de ufc/mL, seguidamente se efectuó la comparación de los resultados del analista 1 en valor absoluto para determinar la repetibilidad del operario de acuerdo a los criterios de aceptabilidad tabla 2 siendo su norma de referencia para esta prueba la AOAC 990.12. Del 2019.

Se visualiza que en la matriz 1 que los valores calculados para la repetibilidad no se encuentran bajo los criterios de aceptabilidad 0.278 para la repetibilidad, probablemente no se homogenizó suficiente la muestra al repetir el análisis ya que se detecta que el valor es menor en D2 a comparación del valor D1.

Tabla 4: Cálculos estadísticos de ANOVA para los resultados en LOG de aerobios mesófilos

	D1	D2	D3	TOTAL
Número (n)	10	10	10	30
$\sum x$	39.3	39.1	39.8	118.2
Significa	3.93	3.91	3.98	11.82
Mediana	3.940	3.920	3.960	
Dev Est.	1.097	1.116	1.048	
Err Est.	0,347	0.353	0,331	

En la tabla 4 podemos evidenciar la desviación de los datos y el error es mayor en el D2 cuando es realizada la repetibilidad sin importar que analista sea que esté haciendo el ensayo y el error estándar es bajo a comparación de la desviación que poseen los datos.

Tabla 5: Resultados de ANOVA para Aerobios mesófilos

	SS	df	MS	F
Entre	0.008	2	0.004	0,003
Dentro	31,924	27	1.182	
Total	31,932	29		

En la tabla 5 se puede visualizar los resultados del test de ANOVA para la técnica de aerobios mesófilos donde nos describe la suma de cuadrados "**SS**", el Grado de libertad, la media de cuadrados y el valor estadístico de la prueba $F=0.003$, Basado en un umbral de valor p de 0.05, no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los duplicados realizados en las pruebas.

Tabla 6: Resultados obtenidos en UFC/mL en placa Petrifilm para Coliformes totales - E. coli

Matriz	Duplica do 1 = D1	Duplica do 2 = D2	Duplica do 3 = D3	L1=Log. D1	L2=Log. D2	L3=Log. D3	Valor r1 - r2	Valor r1 - r3	TEST r	TEST R
1	400	260	360	2,6	2,4	2,6	0,19	0,05	VÁLIDO	VÁLIDO
2	810	1000	980	2,9	3,0	3,0	0,09	0,08	VÁLIDO	VÁLIDO
3	1570	1530	1500	3,2	3,2	3,2	0,01	0,02	VÁLIDO	VÁLIDO
4	300	190	350	2,5	2,3	2,5	0,20	0,07	VÁLIDO	VÁLIDO
5	2000	2100	2300	3,3	3,3	3,4	0,02	0,06	VÁLIDO	VÁLIDO
6	700	650	700	2,8	2,8	2,8	0,03	0,00	VÁLIDO	VÁLIDO
7	300	300	600	2,5	2,5	2,8	0,00	0,30	VÁLIDO	VÁLIDO
8	180	150	200	2,3	2,2	2,3	0,08	0,05	VÁLIDO	VÁLIDO
9	80	70	90	1,9	1,8	2,0	0,06	0,05	VÁLIDO	VÁLIDO
10	250	270	300	2,4	2,4	2,5	0,03	0,08	VÁLIDO	VÁLIDO

Como se observa en la tabla 6 los resultados obtenidos por los analistas del laboratorio de microbiología están en el rango de aceptabilidad que nos da la normativa de referencia AOAC 998.08 para la Repetibilidad que es de un 0.257 y la Precisión intermedia con un valor de 0.391 para este tipo de técnica en Petrifilm Coliformes totales y E. coli.

Tabla 7: Cálculos estadísticos de ANOVA para los resultados en LOG de Coliformes totales - E. coli

	D1	D2	D3	TOTAL
Número (n)	10	10	10	30
$\sum x$	26.4	25.9	27.0	79.3
significa	2.64	2.59	2.70	7.93
Mediana	2.550	2.450	2.700	
Dev Est.	0.422	0.475	0.420	
Err Est.	0.133	0.150	0.133	

En la tabla 7 podemos evidenciar la desviación de los datos y el error no hay gran significancia en los valores, pero si se demuestra que es mayor en el D2 cuando es realizada la repetibilidad sin importar que analista.

Tabla 8: Resultados de ANOVA para Coliformes Totales - E. coli

	SS	df	MS	F
Entre	0,073	2	0,036	0.188
Dentro	5.222	27	0,193	
Total	5.295	29		

Los resultados de ANOVA nos indican con del test de F: 0.188 nos permite decir que el grado de libertad de los datos es muy baja y apoyado en un umbral de valor p de 0.05, no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los duplicados realizados en las pruebas.

Tabla 9: Resultados obtenidos en UFC/mL en placa Petrifilm para S. aureus

Matriz	Duplica do 1 = D1	Duplica do 2 = D2	Duplica do 3 = D3	L1=Log. D1	L2=Log. D2	L3=Log. D3	Valor r1 - r2	Valor r1 - r3	TEST r	TEST R
1	570	530	650	2,8	2,7	2,8	0,03	0,06	VÁLIDO	VÁLIDO
2	850	1100	1160	2,9	3,0	3,1	0,11	0,14	VÁLIDO	VÁLIDO
3	130	70	90	2,1	1,8	2,0	0,27	0,16	VÁLIDO	VÁLIDO
4	370	300	310	2,6	2,5	2,5	0,09	0,08	VÁLIDO	VÁLIDO
5	800	700	800	2,9	2,8	2,9	0,06	0,00	VÁLIDO	VÁLIDO
6	450	500	450	2,7	2,7	2,7	0,05	0,00	VÁLIDO	VÁLIDO
7	300	300	250	2,5	2,5	2,4	0,00	0,08	VÁLIDO	VÁLIDO
8	250	230	300	2,4	2,4	2,5	0,04	0,08	VÁLIDO	VÁLIDO
9	20	15	25	1,3	1,2	1,4	0,12	0,10	VÁLIDO	VÁLIDO
10	750	650	700	2,9	2,8	2,8	0,06	0,03	VÁLIDO	VÁLIDO

Como se observa en la tabla 9 todos los resultados obtenidos por los analistas que realizaron el ensayo están en el criterio de aceptabilidad que nos da la normativa de referencia AOAC 2003.07 para la Repetibilidad que es de un 0.27 y la Precisión intermedia con un valor de 0.75 ya que el juicio de estos valores es muy amplio para este tipo de técnica Petrifilm Staph Express (STX).

Tabla 10: Cálculos estadísticos de ANOVA para los resultados en LOG de S. aureus

	D1	D2	D3	TOTAL
Número (n)	10	10	10	30
$\sum x$	25,0	24,5	25,0	74.4

significa	2,497	2,446	2,500	7.443
Mediana	2.650	2.600	2.600	
Dev Est.	0,498	0,544	0,495	
Err Est.	0,498	0,544	0,495	

En la tabla 10 podemos evidenciar la desviación estándar de los datos obtenidos y el error estándar, demostrando hay mayor margen de error en el D2 comparados con los otros resultados de desviación y errores estándar esto ocurre cuando es realizada la repetibilidad sin importar que analista sea que esté haciendo el ensayo.

Tabla 11: Resultados de ANOVA para S. aureus

	SS	df	MS	F
Entre	0,033	2	0,016	0.062
Dentro	7.102	27	0.263	
Total	7.135	29		

Se demuestra que al realizar la prueba de F se obtiene un valor de 0.062 con este dato nos permite decir que el umbral del valor p de 0.05 no tiene diferencias estadísticas significativas entre los ensayos realizados por los analistas.

Tabla 12: Resultados obtenidos en UFC/mL en placa Petrifilm para Bacterias ácido lácticas

Matriz	Duplica do 1 = D1	Duplica do 2 = D2	Duplica do 3 = D3	L1=Log. D1	L2=Log. D2	L3=Log. D3	Valor r1 - r2 	Valor r1 - r3 	TEST r	TEST R
1	5000	4800	5900	3,7	3,7	3,8	0,02	0,07	VÁLIDO	VÁLIDO
2	990	820	890	3,0	2,9	2,9	0,08	0,05	VÁLIDO	VÁLIDO
3	2000	3000	2500	3,3	3,5	3,4	0,18	0,10	NO VÁLIDO	VÁLIDO
4	30	10	30	1,5	1,0	1,5	0,48	0,00	NO VÁLIDO	VÁLIDO
5	2000	1500	3000	3,3	3,2	3,5	0,12	0,18	VÁLIDO	VÁLIDO
6	340	280	360	2,5	2,4	2,6	0,08	0,02	VÁLIDO	VÁLIDO

7	150	100	130	2,2	2,0	2,1	0,18	0,06	NO VÁLIDO	VÁLIDO
8	580	420	400	2,8	2,6	2,6	0,14	0,16	VÁLIDO	VÁLIDO
9	1900	1600	1100	3,3	3,2	3,0	0,07	0,24	VÁLIDO	VÁLIDO
10	650	820	930	2,8	2,9	3,0	0,10	0,16	VÁLIDO	VÁLIDO

En la tabla 12 se evidencia en la matriz 3, 4 y 7 que es test por repetibilidad no cumple con los criterios ya que este tiene un valor de 0.18, 0.48 y 0.18 respectivamente y el valor tiene que ser menor o igual a 0.141 como se demuestra en la tabla 2, ya que el proceso de homogenización no es el suficiente para tomar una concentración igual a la anterior en el caso de la matriz 4, 7 y con respecto a la matriz 3 un exceso de muestra ya sea tomada o inoculada.

Tabla 13: Cálculos estadísticos de ANOVA para los resultados en LOG de Bacterias Acido Lácticas

	D1	D2	D3	TOTAL
Número (n)	10	10	10	30
$\sum x$	28,3	27,4	28,4	84,13
significa	2,83	2,74	2,84	8,41
Mediana	2.900	2.900	2.950	
Dev Est.	0,643	0,795	0,682	
Err Est.	0,643	0,795	0.216	

En la tabla 13 podemos evidenciar la desviación estándar de los datos y el error estándar, es mayor en el D2 cuando es realizada la repetibilidad sin importar que analista sea que esté haciendo el ensayo.

Tabla 14: Resultados de ANOVA para Bacterias Acido Lácticas

	SS	df	MS	F
Entre	0,067	2	0,033	0.066
Dentro	13.592	27	0,503	
Total	13,659	29		

En la tabla 14 se puede visualizar los resultados del test de ANOVA para la técnica de Bacterias acido lácticas donde nos describe la suma de cuadrados “**SS**”, el Grado de

libertad, la media de cuadrados y el valor estadístico de la prueba F con un valor de 0.066, de tan manera nos basamos en un umbral de valor p de 0.05, no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los duplicados realizados en las pruebas.

Tabla 15: Resultados obtenidos en UFC/mL en placa Petrifilm para Mohos y levaduras

Matriz	Duplica do 1 = D1	Duplica do 2 = D2	Duplica do 3 = D3	L1=Log. D1	L2=Log. D2	L3=Log. D3	Valor r1 - r2	Valor r1 - r3	TEST r	TEST R
1	11400	14100	12000	4,1	4,1	4,1	0,09	0,02	VÁLIDO	VÁLIDO
2	150	100	270	2,2	2,0	2,4	0,18	0,26	VÁLIDO	VÁLIDO
3	100	200	300	2,0	2,3	2,5	0,30	0,48	VÁLIDO	NO VÁLIDO
4	310	360	350	2,5	2,6	2,5	0,06	0,05	VÁLIDO	VÁLIDO
5	3000	3100	2900	3,5	3,5	3,5	0,01	0,01	VÁLIDO	VÁLIDO
6	1000	900	1000	3,0	3,0	3,0	0,05	0,00	VÁLIDO	VÁLIDO
7	150	300	100	2,2	2,5	2,0	0,30	0,18	VÁLIDO	VÁLIDO
8	500	480	600	2,7	2,7	2,8	0,02	0,08	VÁLIDO	VÁLIDO
9	100	180	250	2,0	2,3	2,4	0,26	0,40	VÁLIDO	NO VÁLIDO
10	800	850	900	2,9	2,9	3,0	0,03	0,05	VÁLIDO	VÁLIDO

Como se demuestra en la tabla 15 se aprecia el error en las matrices 3 y 9 que tienen valores de criterios de aceptabilidad de 0.37 para la Precisión intermedia, en donde la 3 y la 7 tiene errores superiores como lo son 0.48 y 0.40 respectivamente, demostrando que al realizar este procedimiento fallo la homogeneización o el pipeteo no fue eficaz a la hora de tomar la muestra, arrojando resultados erróneos a la hora del recuento.

Tabla 16: Cálculos estadísticos de ANOVA para los resultados en LOG de Mohos y levaduras

	D1	D2	D3	TOTAL
Número (n)	10	10	10	30
$\sum x$	27,0	27,8	28,1	82,90
significa	2,7	2,8	2,8	8,29
$\sum x^2$	44.15	45.11	47.32	136.579
Mediana	2.600	2.650	2.650	
Dev Est.	0,687	0.624	0.614	
Err Est.	0,687	0.624	0.614	

En la tabla 16 podemos evidenciar la desviación estándar de los datos y el error estándar, es mayor en el D1 cuando es realizada la repetibilidad sin importar que analista sea que esté haciendo el ensayo.

Tabla 17: Resultados de ANOVA para Mohos y Levaduras

	SS	df	MS	F
Entre	0,065	2	0,032	0,078
Dentro	11.154	27	0.413	
Total	11.219	29		

En la tabla 17 se puede visualizar los resultados del test de ANOVA para la técnica de Mohos y levaduras donde nos describe la suma de cuadrados “**SS**”, el Grado de libertad, la media de cuadrados y el valor estadístico de la prueba F con un valor de 0.078, de tan manera nos basamos en un umbral de valor p de 0.05, no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los duplicados realizados en las pruebas.

Como se aprecia en la tabla 2 el valor de precisión intermedia es mayor en todos los criterios de referencia sin importar los medios de Petrifilm que son sembrados a diferencia que la repetibilidad que este valor es menor. Debido a que la capacitación o las condiciones en las que se realice el método no pueden ser las mismas pueden aumentar más la incertidumbre de la prueba a diferencia de la repetibilidad que se hace en un lapso corto de tiempo en el cual las condiciones no van a cambiar significativamente.

Por lo anterior se discute que se ha tenido más fallos en la repetibilidad por que los criterios de aceptabilidad de cada uno de los ensayos son muy bajo la probabilidad del error es mayor a diferencia de la reproducibilidad.

Al poseer datos tan variados en la matriz de repetibilidad y precisión intermedia no hay una correlación entre los resultados obtenidos en las matrices analizadas la desviación va aumentar como lo es el caso de aerobios mesófilos que cada una de las matrices se ve un valor de entre ellas de 0.004 pero al compararlo con las demás matrices el valor aumenta a un 1.183, al extremos contrario tendríamos a *S. aureus* que tiene una alta semejanza en los resultados que se obtiene a los largo de la matriz ya que entre ellas se obtiene un valor de 0.016 y con respecto a las otras matrices un valor de 0.263, por ende se demuestra que este tipo análisis no es congruente en lo que se quiere llegar, para llegar y realizar la verificación del personal calificado cada de uno de ellos debería hacerla con un concentración igual en cada uno de los ensayos para determinar con mayor veracidad el resultado demostrando el acercamiento o el alejamiento que tienen los analistas en los resultados a un resultado óptimo.

7. CONCLUSIONES

Se logró determinar que los parámetros microbiológicos van a depender del analista u operario que esté realizando el ensayo, debido a la forma que cada uno de ellos procesa la muestra.

Dentro del proceso de verificación el cálculo y análisis de la incertidumbre es importante, ya que nos va a permitir determinar la capacidad de la técnica en los ensayos, permitiendo así poder comparar mediciones entre sí o con otros valores de referencia dados en especificaciones o normativa.

Se identificó que las posibles variaciones son al momento de la homogenización a la hora de tomar las muestras y el tiempo que se demora en depositar la muestra; ya que al ser una Pipeta Electrónica se toman varios volúmenes aspirados por ella y dispensa dependiendo la cantidad solicitada, si se demora la inoculación en la placa Petrifilm el contenido se va a precipitar hacia el fondo y las primeras dispensas van a salir con una alta concentración de microorganismo en comparación con las siguientes; debido a que las analistas no siembran en el mismo orden pueden variar en los resultados.

Debido a una alta discrepancia entre los resultados de cada una de las matrices, la desviación estándar más bajas es para Coliformes totales y *E.coli con* (0.422, 0.475, 0.420) seguidamente *S. aureus* con (0.498,0.544, 0.495), posteriormente Mohos y Levaduras con (0.687, 0.624, 0.614) y consecutivamente Bacterias Acido Lácticas con (0.643, 0.795, 0.682) y finalmente la desviación más altas entre ellos es para Aerobios Mesófilos que tiene desviaciones de (1.097, 1.116, 1.048).

La desviación de los datos se encuentra más alta en el valor D2 de todas las técnicas a excepción de mohos y levaduras, demostrando el alto impacto que tiene el analista del laboratorio de microbiología a la hora de la realización de los ensayos.

Con base a los resultados obtenidos en las tablas se evidencio que se obtiene un mayor margen de error cuando el analista realiza la repetitividad de la misma prueba, que cuando se realiza la precisión intermedia de la prueba, esto nos indicó que el analista que tuvo mayor error denominado LM necesita agilidad, practicidad y agudeza a la hora de la realización de los ensayos para que sea eficiente el resultado obtenido.

A la hora de determinar la repetibilidad y Precisión intermedia va a ser crítico el valor de la incertidumbre a la hora de realizar pruebas en el laboratorio, ya que este, aunque está dado por los ensayos o técnicas nos difiere en el nivel de aceptación o rechazo de la prueba, como se ve en la tabla 2 hay variaciones en la aceptabilidad para la determinación de si la prueba tiene un margen de error.

8. BIBLIOGRAFÍA

Alamilla, H. D. (2005). Estimación de la invertidumbre en metodos de ensayo de construcción. Sanfadilla, Qro.

Cortez, L. (1999). The implementation of acceditatin in a chemical laboratory. Science direct, 6.

Deinhardt, S., Sachse, S., Geraci, J., Fischer, C., Kwetkat, A., Dawczynski, K., . . . Loffer, B. (2018). Virulence patterns of Staphylococcus aureus strains from nasopharyngeal colonization. Journal of Hospital Infection, 1-7. Ediciones Castilla. 664 p.

Engineered Software, Inc. (www.engineeredsoftware.com/pepers/msa_rr.pdf). Copyright 1999.

EURACHEM. (2005). Métodos analíticos adecuados a su laboratorio. Queretaro.

Guidelines for the methodical validation and verification of virus diagnostic laboratory tests. J Clin Virol, 40 (2007), pp. 93-98

H.F. Rabenau, H.H. Kessler, M. Kortenbusc, A. Steinhorst, A. Berger.

<http://db2.doyma.es/pdf/126/126v57n03a13017206pdf001.pdf>

Hu, D. L., Wang, L., Fang, R., Okamura, M., & Ono, H. (2018). Staphylococcus aureus. Chapter 3 - Staphylococcus aureus Enterotoxins (págs. 39-55). Academic Press.

ILAC . (2013). Recommended guide for enganguing with government . IAF.

International Standard. ISO 6887 – 1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. First edition, 1999-02-15.

Juran, J. (1981). El liderazgo para la calidad. Diaz De Santos s.a.metodo.pdf).

Lessells, C.M. & Boag, P.T. (I 987) Unrepeatable repeatabilities: a common

Leverton, R. (I 989) Wing length changes in individually-marked Blackbirds

Lyhs, U. (2002). Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Academic Dissertation, Department of Food and Environmental Hygiene. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki. ISBN 952-91-4642-6.

Mirhoseinia, A., Amania, J., & Naza, S. (2018). Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic Escherichia coli and vaccines against it. Microbial Pathogenesis, 117, 162-169.

mistake. Auk 104, I 16-121

Moroto, A. (1999). Evaluating uncertainty in routine analysis . Trends in analytical chemistry , 9-10.

Norma NTC-2194 Vocabulario de términos básicos y generales en metrología.

NTC-ISO-17025 Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayos y calibración.

Pedroso, E. (2004). Breve historia del desarrollo de la ciencia . ACIMED , V.12 N 2.

Puentes, S., & Dustan, M. (2018). Escherichia coli Complications in Pediatric Critical Care. Critical Care Nursing Clinics of North America, 30(1).

Skoog, D. (2001). Analisis instrumental. Mexico DF: McGraw-Hill.

Tecnológico de Monterrey (<http://academia.gda.itesm.mx/~mdeluna/control/ryr>

Términos y definiciones utilizados en relación con los materiales de referencia.

Tortajada, F.; Castell, G.; Tornero, B.; Gimeno, C. 2001. Micotoxinas y cáncer pediátrico

Validación y verificación de métodos microbiológicos». Procedimientos microbiológicos. SEIMC. 2013; 48:1-35 [consultado 18 Sep 2013]. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia>.

Ciencia. Aplicada a la Vida. y Petrifilm son marcas registradas de 3M. © 3M, 2017

EURACHEM. (2005). Métodos analíticos adecuados a su laboratorio. Queretaro.

Scientia et Technica Año XIII, No 35, agosto de 2007. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701

SPC (1991) Statistical process control. Edition December 1991, AIAG, Automotive Industry Action Group.

Larpent, J.P. (1995a). Las bacterias lácticas. En ICMSF, Microbiología Alimentaria Vol. 2., Las fermentaciones alimentarias. (pp. 3-17). Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.

MSA (2002) Measurement systems analysis. Third edition March 2002, AIAG, Automotive Industry Action Group.

Boubetra et al - Appl Environ Microbiol (77):11, 2011).

Pelczar, M.; Reid, R. 1966. Microbiología. Trad. L. Hontañón. 2 ed. Madrid, España,

Guía ISO 30, (1992), pp. 1-23

AOAC Research Institute Validation Outline for 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate (RYM), Approved – December 2013.

AOAC Research Institute Validation Outline for 3M™ Petrifilm™ Rapid Aerobic Count Plate for the Enumeration of Total Viable Count in a Variety of Foods, Approved – December 2014.

Jechorek, R., Evaluation of the 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate (RYM), AOAC® Performance TestedSM certification number 121301.

Jechorek. R.P., 3M™ Petrifilm™ Rapid Aerobic Count Plate for the Enumeration of Total Viable Count in a Variety of Foods, AOAC® Performance TestedSM certification number 121403.

Cruz, J. (1999). La histtoria de la calidad. Excelentia , 8-14.

Turdus merula following moult. Ringing& Migration 10, 17-25

ANEXOS

Definiciones

Analito: componente medido por el método de análisis. En el caso de métodos microbiológicos esto es el microorganismo sus componentes o productos asociados (enzimas o toxinas).

Especificidad: (para un tipo de matriz y un nivel de inoculación dado): Fracción del número total de cultivos o colonias negativos que son asignados correctamente con el método utilizado.

Exactitud de medida: proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando.

Método cualitativo: método de análisis cuya respuesta es la presencia o ausencia del analito, detectado de forma directa o indirecta en una cierta cantidad de muestra.

Método cuantitativo: método de análisis cuya respuesta es la cantidad del analito medido de forma directa (enumeración en masa o volumen), o indirecta (color, absorbancia, impedancia, etc.) en una cierta cantidad de muestra.

Método de referencia: método internacionalmente reconocido y ampliamente aceptado.

Repetibilidad: precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad.

Nota: Este conjunto de condiciones incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodo corto de tiempo.

Rango de validación: rango de número medio de partículas por porción analítica para el cual las expectativas de las especificaciones de validación (en particular linealidad) han sido aceptablemente demostradas.

Precisión intermedia: precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de precisión intermedia

Reproducibilidad: precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad.

Nota: Este conjunto de condiciones incluye diferentes lugares, operadores, sistemas de medida y mediciones repetidas de los mismos objetos u objetos similares. Los diferentes sistemas de medición pueden utilizar diferentes procedimientos de medida. En la práctica, conviene que toda especificación relativa a las condiciones incluya las condiciones que varían y las que no.

Validación: Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.

Verificación: Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados.

Tabla 18: Matriz de Repetibilidad y Precisión intermedia completa para Aerobios mesofilos.

Num de Matriz	Fecha (AAAA-MM-DD)	Duplicado 1 = D1	Duplicado 2 = D2	ANALISTA (1)	Duplicado 3 = D3	ANALISTA (2)	L1=Log.D 1	L2=Log. D2	L3=Log. D3	Valor Absoluto de r1 - r2	Valor Absoluto de r1 - r3	RESULTADO TEST r	RESULTADO TEST R
1	24/05/2019	19500	10100	LM	13500	AM	4,3	4,0	4,1	0,29	0,16	NO VÁLIDO	VÁLIDO
2	27/05/2019	9000	9200	AM	8900	LM	4,0	4,0	3,9	0,01	0,00	VÁLIDO	VÁLIDO
3	6/06/2019	500	300	CB	700	LM	2,7	2,5	2,8	0,22	0,15	VÁLIDO	VÁLIDO
4	10/06/2019	2000	3000	LM	4000	CB	3,3	3,5	3,6	0,18	0,30	VÁLIDO	VÁLIDO
5	20/06/2019	300000	330000	CB	310000	AM	5,5	5,5	5,5	0,04	0,01	VÁLIDO	VÁLIDO
6	25/06/2019	250000	270000	AM	250000	CB	5,4	5,4	5,4	0,03	0,00	VÁLIDO	VÁLIDO
7	4/07/2019	900	900	CB	1000	AM	3,0	3,0	3,0	0,00	0,05	VÁLIDO	VÁLIDO
8	8/07/2019	7800	8000	AM	8200	LM	3,9	3,9	3,9	0,01	0,02	VÁLIDO	VÁLIDO
9	16/07/2019	250	280	LM	350	CB	2,4	2,4	2,5	0,05	0,15	VÁLIDO	VÁLIDO
10	22/07/2019	80000	90000	CB	80000	AM	4,9	5,0	4,9	0,05	0,00	VÁLIDO	VÁLIDO

Tabla 19: Matriz de Repetibilidad y Precisión intermedia completa para Coliformes totales - E.coli

Num de Matriz	Fecha (AAAA-MM-DD)	Duplicado 1 = D1	Duplicado 2 = D2	ANALISTA (1)	Duplicado 3 = D3	ANALISTA (2)	L1=L og.D 1	L2=Log. D2	L3=Log. D3	Valor Absoluto de r1 - r2	Valor Absoluto de r1 - r3	RESULTADO TEST r	RESULTADO TEST R
1	24/05/2019	400	260	LM	360	AM	2,6	2,4	2,6	0,19	0,05	VÁLIDO	VÁLIDO
2	27/05/2019	810	1000	AM	980	LM	2,9	3,0	3,0	0,09	0,08	VÁLIDO	VÁLIDO
3	6/06/2019	1570	1530	CB	1500	LM	3,2	3,2	3,2	0,01	0,02	VÁLIDO	VÁLIDO
4	10/06/2019	300	190	LM	350	CB	2,5	2,3	2,5	0,20	0,07	VÁLIDO	VÁLIDO
5	20/06/2019	2000	2100	CB	2300	AM	3,3	3,3	3,4	0,02	0,06	VÁLIDO	VÁLIDO
6	25/06/2019	700	650	AM	700	CB	2,8	2,8	2,8	0,03	0,00	VÁLIDO	VÁLIDO
7	4/07/2019	300	300	CB	600	AM	2,5	2,5	2,8	0,00	0,30	VÁLIDO	VÁLIDO
8	8/07/2019	180	150	AM	200	LM	2,3	2,2	2,3	0,08	0,05	VÁLIDO	VÁLIDO
9	16/07/2019	80	70	LM	90	CB	1,9	1,8	2,0	0,06	0,05	VÁLIDO	VÁLIDO
10	22/07/2019	250	270	CB	300	AM	2,4	2,4	2,5	0,03	0,08	VÁLIDO	VÁLIDO

Tabla 20: Matriz de Repetibilidad y Precisión intermedia completa para *S. aureus*

Num de Matriz	Fecha (AAAA-MM-DD)	Duplicado 1 = D1	Duplicado 2 = D2	ANALISTA (1)	Duplicado 3 = D3	ANALISTA (2)	L1=L og.D1	L2= Log. D2	L3= Log. D3	Valor Absoluto de r1 - r2	Valor Absoluto de r1 - r3	RESULTADO TEST r	RESULTADO TEST R
1	24/05/2019	570	530	LM	650	AM	2,8	2,7	2,8	0,03	0,06	VÁLIDO	VÁLIDO
2	27/05/2019	850	1100	AM	1160	LM	2,9	3,0	3,1	0,11	0,14	VÁLIDO	VÁLIDO
3	6/06/2019	130	70	CB	90	LM	2,1	1,8	2,0	0,27	0,16	VÁLIDO	VÁLIDO
4	10/06/2019	370	300	LM	310	CB	2,6	2,5	2,5	0,09	0,08	VÁLIDO	VÁLIDO
5	20/06/2019	800	700	CB	800	AM	2,9	2,8	2,9	0,06	0,00	VÁLIDO	VÁLIDO
6	25/06/2019	450	500	AM	450	CB	2,7	2,7	2,7	0,05	0,00	VÁLIDO	VÁLIDO
7	4/07/2019	300	300	CB	250	AM	2,5	2,5	2,4	0,00	0,08	VÁLIDO	VÁLIDO
8	8/07/2019	250	230	AM	300	LM	2,4	2,4	2,5	0,04	0,08	VÁLIDO	VÁLIDO
9	16/07/2019	20	15	LM	25	CB	1,3	1,2	1,4	0,12	0,10	VÁLIDO	VÁLIDO
10	22/07/2019	750	650	CB	700	AM	2,9	2,8	2,8	0,06	0,03	VÁLIDO	VÁLIDO

Tabla 21: Matriz de Repetibilidad y Precisión intermedia completa para Bacterias ácido lácticas.

Num de Matriz	Fecha (AAAA-MM-DD)	Duplicado 1 = D1	Duplicado 2 = D2	ANALISTA (1)	Duplicado 3 = D3	ANALISTA (2)	L1=L og.D1	L2= Log. D2	L3= Log. D3	Valor Absoluto de r1 - r2	Valor Absoluto de r1 - r3	RESULTADO TEST r	RESULTADO TEST R
1	24/05/2019	5000	4800	LM	5900	AM	3,7	3,7	3,8	0,02	0,07	VÁLIDO	VÁLIDO
2	27/05/2019	990	820	AM	890	LM	3,0	2,9	2,9	0,08	0,05	VÁLIDO	VÁLIDO
3	6/06/2019	2000	3000	CB	2500	LM	3,3	3,5	3,4	0,18	0,10	NO VÁLIDO	VÁLIDO
4	10/06/2019	30	10	LM	30	CB	1,5	1,0	1,5	0,48	0,00	NO VÁLIDO	VÁLIDO
5	20/06/2019	2000	1500	CB	3000	AM	3,3	3,2	3,5	0,12	0,18	VÁLIDO	VÁLIDO
6	25/06/2019	340	280	AM	360	CB	2,5	2,4	2,6	0,08	0,02	VÁLIDO	VÁLIDO
7	4/07/2019	150	100	CB	130	AM	2,2	2,0	2,1	0,18	0,06	NO VÁLIDO	VÁLIDO
8	8/07/2019	580	420	AM	400	LM	2,8	2,6	2,6	0,14	0,16	VÁLIDO	VÁLIDO
9	16/07/2019	1900	1600	LM	1100	CB	3,3	3,2	3,0	0,07	0,24	VÁLIDO	VÁLIDO
10	22/07/2019	650	820	CB	930	AM	2,8	2,9	3,0	0,10	0,16	VÁLIDO	VÁLIDO

Tabla 22: Matriz de Repetibilidad y Precisión intermedia completa para Mohos y levaduras

Num de Matriz	Fecha (AAAA-MM-DD)	Duplicado 1 = D1	Duplicado 2 = D2	ANALISTA (1)	Duplicado 3 = D3	ANALISTA (2)	L1=Log.D1	L2=Log.D2	L3=Log.D3	Valor Absoluto de r1 - r2	Valor Absoluto de r1 - r3	RESULTADO TEST r	RESULTADO TEST R
1	24/05/2019	11400	14100	LM	12000	AM	4,1	4,1	4,1	0,09	0,02	VÁLIDO	VÁLIDO
2	27/05/2019	150	100	AM	270	LM	2,2	2,0	2,4	0,18	0,26	VÁLIDO	VÁLIDO
3	6/06/2019	100	200	CB	300	LM	2,0	2,3	2,5	0,30	0,48	NO VÁLIDO	NO VÁLIDO
4	10/06/2019	310	360	LM	350	CB	2,5	2,6	2,5	0,06	0,05	VÁLIDO	VÁLIDO
5	20/06/2019	3000	3100	CB	2900	AM	3,5	3,5	3,5	0,01	0,01	VÁLIDO	VÁLIDO
6	25/06/2019	1000	900	AM	1000	CB	3,0	3,0	3,0	0,05	0,00	VÁLIDO	VÁLIDO
7	4/07/2019	150	300	CB	100	AM	2,2	2,5	2,0	0,30	0,18	NO VÁLIDO	VÁLIDO
8	8/07/2019	500	480	AM	600	LM	2,7	2,7	2,8	0,02	0,08	VÁLIDO	VÁLIDO
9	16/07/2019	100	180	LM	250	CB	2,0	2,3	2,4	0,26	0,40	VÁLIDO	NO VÁLIDO
10	22/07/2019	800	850	CB	900	AM	2,9	2,9	3,0	0,03	0,05	VÁLIDO	VÁLIDO