



Reporte Final de Estadía

Alejandro Solís Torres

Confirmación de métodos microbiológicos
(*Coliformes totales y fecales*) en el
laboratorio Higienyc Sanitary.

Programa Educativo:

Ingeniería en Procesos Bioalimentarios.

Proyecto de estadía realizado en:

Laboratorio Higienyc Sanitary

Nombre del Proyecto:

Confirmación de métodos microbiológicos (*Coliformes totales y fecales*) en el laboratorio Higienyc Sanitary.

Nombre del Asesor Industrial:

ING. Tania Pauline Poot.

Nombre del Asesor Académico

MC. Olivia Rodríguez Alcalá.

Nombre del Alumno:

Alejandro Solís Torres.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ÍNDICE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.2 Antecedentes de la empresa.....	5
1.3 Planteamiento del problema.....	7
1.4 Objetivos	8
1.4.1 Objetivo General	8
1.4.2 Objetivos Específicos	8
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1 Acreditación.....	9
2.2 Norma ISO/IEC 17025.....	9
2.3 Validación:	10
2.3.1 Validación primaria:.....	10



2.3.2 Validación secundaria:	10
2.3.3 Conformación	11
2.4 Método de recuento en placa para Coliformes Totales.....	12
2.5 Grupo Coliformes:	13
2.5.1 Escherichia coli (E. coli):	13
2.6 Colonias:	15
2.7 Dilución decimal:.....	15
2.8 Diluciones decimales adicionales:	15
2.9 Analito:.....	15
2.10 Blanco:.....	15
2.11 Conjunto de detección:	16
2.12 Matrices:	16
2.13 Nivel de fortificación:.....	16
2.14 Parámetros de desempeño de confirmación:	16
2.14.1 Sensibilidad:	16
2.14.2- Falso positivo:.....	16
2.14.3 Falso negativo:	17



2.14.4 Límite de detección:	17
2.14.5 Límite de cuantificación:	17
2.14.6 Linealidad:	17
2.14.7 Coeficiente de Variación (CV):	17
2.14.8 Desviación estándar:	18
2.14.9 Repetibilidad:	18
2.14.10.- Reproducibilidad:	18
2.14.11 Intervalo de confianza:	18
2.14.12 Sesgo:	19
2.14.13 Recuperación:	19
2.14.14. Incertidumbre:	19
3. METODOLOGÍA	20
3.1 Criterios para la confirmación de métodos de la ISO/IEC-17025-2006.....	20
3.1.1 Control de calidad de los medios de cultivo	20
3.3 Control de ambientes:	21
3.4 Tinción de Gram:	21
3.5 Control de equipos:	22



3.6 Desarrollo de procedimiento de confirmación del método microbiológico.....	22
3.6.1 Elaboración de Protocolo	22
3.6.2 Selección de la matriz.....	22
3.6.3 Preparación del inóculo	23
3.6.4 Preparación de las muestras.....	24
3.6.4.1 Dilución y homogenización de las muestras.....	24
3.6.4.2 Fortificación de las muestras.....	24
3.6.4.3 Recuento en placa para Coliformes totales.....	24
3.6.5 Ejecución del protocolo.....	25
3.6.5.1 Niveles de inóculo	26
3.6.6 Cálculos	27
3.6.6.1 Repetibilidad:	27
3.6.6.2 Reproducibilidad:	28
3.6.6.3 Recuperación:	28
3.6.6.4 Sesgo:.....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1 Control de calidad de los medios de cultivo	30



4.2 Control de ambientes:	31
4.3 Tinción de Gram	33
4.4 Control de equipos	34
4.5 Protocolo para la cuenta de microorganismos Coliformes totales en placa	35
4.6 Selección de la matriz	38
4.7 Preparación del inóculo	39
4.7.1 Activación de la cepa de trabajo	39
4.7.2 Selección de la dilución de trabajo	42
4.8 Preparación de muestras	42
4.10 Cálculos	44
4.10.1 Ensayos de confirmación del método de recuento en placa para Coliformes totales en muestras de leche	46
4.10.1.1 Ensayos de repetibilidad de Coliformes totales	46
4.10.1.2 Reproducibilidad:	56
4.10.1.3 Porcentaje de recuperación (PR)	61
4.10.1.4 Sesgo	61
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	63
5.1 Conclusiones	63



5.2 Recomendaciones	64
6. REFERENCIAS	65
Anexos:	66
Anexo 1. Cronograma de actividades.....	67
Anexo 2. Formato de elaboración de protocolo.....	68
Anexo 3. Metodología para determinación de Coliformes totales por cuenta en placa.....	69

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de los productos de interés sanitario	23
Tabla 2 Criterios de aceptación para métodos cuantitativos.....	26
Tabla 3 Recuento del control de ambientes.....	32
Tabla 4 Medios y reactivos utilizados en el método de confirmación	37
Tabla 5 Cepas de control de la familia Enterobacteriaceae.....	37
Tabla 6 Características de la matriz	38
Tabla 7 Crecimiento bacteriano en placas de agar cuenta estándar.....	40
Tabla 8 Resultados de recuento en placa para Coliformes totales de la muestra n°1 ensayo de repetibilidad.....	47
Tabla 9 Resultados de recuento en placa para Coliformes totales de la muestra n° 2 ensayo de repetibilidad.....	48
Tabla 10 Análisis de varianzas, desviación estándar y coeficiente de variación prueba repetibilidad recuento en placa de C. Totales en leche (muestra 2).....	51
Tabla 11 Resultado de recuentos obtenidos para siembra en placa de Coliformes totales en solución diluyente (muestra 3).....	52
Tabla 12 Análisis de varianzas, desviación estándar y coeficiente de variación prueba repetibilidad recuento en placa de C. Totales de solución diluyente (muestra 3)	54
Tabla 13 Resultados obtenidos en muestra n° 4 de verificación de la esterilidad	55
Tabla 14 Resultados de recuento en placa de Coliformes totales en muestra de leche pasteurizada evaluada en diferentes horas (ensayo de reproducibilidad 1) muestra n°5	56
Tabla 15 Resultados recuentos en placa de Coliformes totales en muestra de leche en diferentes horas (ensayo reproducibilidad 2) muestra n°6.....	58
Tabla 16 Análisis de varianzas, desviación estándar y coeficiente de variación de la prueba de reproducibilidad para recuento en placa de C. Totales en leche a diferentes horas (ensayo de producibilidad 2) muestra n°6	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Placas de control de ambientes sin crecimiento	32
Figura 2. Coliformes totales en muestra de leche. Prueba de repetibilidad	33
Figura 3. Diagrama de flujo del método para la determinación de Coliformes totales	35
Figura 4. Crecimiento de cepas E. coli en agar base sangre	40
Figura 5. Diluciones decimales de cepa E. coli	41
Figura 6. Crecimiento de E. coli en placas	41
Figura 7. Resultado de prueba de repetibilidad en muestra número 1	48
Figura 8. Resultados de prueba de repetibilidad de Coliformes totales en muestra numero 2	49
Figura 9. Gráfica de dispersión Resultado de prueba de repetibilidad	
Recuento en placa de Coliformes Totales en muestra de leche	50
Figura 10. Coliformes totales en solución de agua peptonada inoculada, muestra numero 3 .	52
Figura 11. Grafica de dispersión Resultado de prueba de repetibilidad	
Recuento en placa de Coliformes Totales en solución diluyente	53
Figura 13. Resultados de recuento en placa de Coliformes totales en prueba de	
reproducibilidad (repetición 1, 1:00 p.m p.m.).	58
Figura 14 Gráfica de dispersión prueba de reproducibilidad de Coliformes totales a las	
diferentes horas analizadas, muestra numero 6.....	59

RESUMEN

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de control de calidad Higienyc Sanitary, teniendo como principal objetivo la confirmación de uno de los métodos microbiológicos más importantes en el análisis de alimentos, como es el método para la cuenta de microorganismos *Coliformes totales* en placa, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos. Al mismo tiempo se deja constancia de los procedimientos como referencia para el correcto uso del método microbiológico. Para el desarrollo del objetivo de estudio se empleó metodología analítica como la estandarización del inóculo bacteriano, a partir del cual fueron preparadas soluciones diluidas para los diferentes niveles de inóculo. Para realizar la validación se llevaron a cabo pruebas en las que se evaluaron los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad de la técnica, mediante el desarrollo de este método bajo las mismas condiciones y bajo condiciones alteradas, variando el tiempo de análisis; la conformación del método se llevó a cabo en una muestra de leche pasteurizada, la cual fue inoculada con una concentración conocida de la cepa de referencia. Los resultados obtenidos fueron estudiados mediante el análisis de la desviación estándar y del coeficiente de variación, en las que se determina el grado de concordancia de las mediciones.

ABSTRACT

The present research was carried out in the Higienyc Sanitary Quality Control Laboratory, with the main objective being the confirmation of one of the most important microbiological methods in food analysis, such as the plate count method for total coliforms, using A selective medium (bile violet red agar) in which bacteria develop at 35 ° C in about 24 h, resulting in the production of gas and organic acids. At the same time the procedures are registered as a reference for the correct use of the microbiological method. For the development of the study objective, analytical methodology was used as the standardization of the bacterial inoculum, from which diluted solutions were prepared for the different levels of inoculum. In order to carry out the validation, tests were carried out in which the repeatability and reproducibility parameters of the technique were evaluated by the development of this method under the same conditions and under altered conditions, varying the analysis time; The conformation of the method was carried out in a sample of pasteurized milk, which was inoculated with a known concentration of the reference strain. The obtained results were studied by the analysis of the standard deviation and the coefficient of variation, in which the degree of agreement of the measurements is determined.

1. INTRODUCCIÓN

Diariamente estamos expuestos a una serie de riesgos que pueden mermar o dañar nuestra salud, algunos de estos son provocados por consumo de productos insalubres. Por eso es necesaria la existencia de laboratorios de análisis públicos y privados que ayuden a prevenir y proteger a la sociedad contra los riesgos sanitarios. Debido a esto, el desarrollo y realización de análisis de control microbiológico es una herramienta que tiene una repercusión decisiva en el ámbito de la salud pública, de la tecnología alimenticia y del medio ambiente. En los últimos años las actividades relacionadas con la validación y confirmación de métodos analíticos han cobrado gran importancia debido por un lado al continuo desarrollo y actualización de técnicas y equipos analíticos cada vez más complejos y por el otro lado al interés de los profesionales en garantizar la calidad de sus procesos y resultados.

El proceso de confirmación de técnicas microbiológicas aplica para demostrar que un método de medida ya validado ha sido implementado de inicio en laboratorio conforme los requisitos y características establecidas. El objetivo de realizar la confirmación de métodos normalizados es asegurar la calidad de los resultados y mejorar la credibilidad y confianza del cliente. Además, ayuda a la regulación y el cumplimiento de la normatividad gubernamental, a la reducción de costos en el laboratorio y como requisito para dar cumplimiento a la norma ISO/IEC 170025 en la que se establecen los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración.

Para realizar la confirmación de un método microbiológico se debe tener en cuenta la evaluación de los medios de cultivo a utilizar para la recuperación de la flora bacteriana presente en el producto; también se debe llevar a cabo la calibración y verificación de los equipos que se utilizan en este tipo de técnicas, asegurar las condiciones ambientales y cumplir con la trazabilidad metrológica establecida del método.

A diferencia de las ciencias físicas y químicas, en microbiología se trabaja con microorganismos que se multiplican por división binaria y crecen exponencialmente. Mientras tanto el grupo de los microorganismos *Coliformes* es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas. El

uso de del grupo *Coliformes* como indicador sanitario puede aplicarse para la detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos. Debido a esto, la creciente demanda de las empresas por demostrar y asegurar la calidad de sus alimentos, se hace tan necesaria la confirmación de los métodos microbiológicos en los laboratorios de calidad. Este proyecto está basado en dos aspectos fundamentales; por una parte, la capacidad para realizar el análisis de forma correcta conforme los parámetros de calidad del método y por otra la correcta adecuación de los mismos a las condiciones del laboratorio.

1.2 Antecedentes de la empresa

En 1980 el Dr. José Alejandro Sepúlveda García al inició actividades en el Hospital General de Cancún de la Secretaria de Salud realizando la actividad de epidemiólogo, función enfocada a la vigilancia epidemiológica de enfermedades infecto-contagiosas en la zona norte del estado de Quintana Roo. Se implementan controles microbiológicos mediante la realización de análisis de superficies en diferentes áreas del hospital (quirófanos, área de enfermos infecto-contagiosos) para la detección y prevención oportuna de brotes de enfermedades en la población asistente al hospital como del personal que labora en él. En el mismo año se presenta un caso de VIBRIO CHOLERAЕ en una turista de nacionalidad americana que visita Cancún de vacaciones y en su retorno a la ciudad de Nueva York, Estados Unidos, se le diagnostica CÓLERA, enfermedad de reporte obligatorio por lo cual las autoridades sanitarias americanas contactan a sus similares en México y se realiza durante 3 meses un trabajo de investigación epidemiológica en la ciudad de Cancún con la finalidad de detectar el punto de origen de contagio, por lo cual con la participación de un equipo de investigadores del Centro de Control de Enfermedades de la ciudad de Atlanta, Georgia, E.E.U.U.; epidemiólogos de la Secretaria de Salubridad de la Cd. de México y el Dr. Sepúlveda como epidemiólogo en la Cd. de Cancún, realizaron investigaciones que comprenden la realización de muestreos microbiológicos de alimentos, agua potable, hielo, aguas residuales, alimentos preparados en hoteles y análisis microbiológicos de enfermos con cuadros diarreicos en la zona y que asisten a recibir atención médica tanto en instituciones del sector salud gubernamental como privados. Con estos antecedentes se toma la iniciativa en 1982 de implementar en la industria hotelera y restaurantera de Cancún controles microbiológicos de los alimentos, personal y equipos para lo cual se realizan análisis, capacitación de personal y auditorias sanitarias, actividades que se formalizan en 1990 con la invitación por parte de la Secretaría de Turismo para participar en la implementación del PROGRAMA DISTINTIVO H, programa enfocado a evitar la presencia de ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS en turistas nacionales y extranjeros, seguimientos de seguridad que se convierten en normas y se implementan hasta 1994 por parte de la Secretaría de Salud. Desde 1990 hasta el momento actual el Dr. José

Alejandro Sepúlveda García participa activamente como Consultor de Distintivo H de la Secretaria de Turismo. En abril de 2011 se inauguran las instalaciones de HIGIENYC SANITARY en la Cd. de Cancún con un laboratorio de CONTROL SANITARIO, empresa que actualmente ofrece servicios de asesoría y control sanitario en Cancún, Cozumel, Isla Mujeres, Puerto Morelos, Playa del Carmen, Riviera Maya así como en otros estados de la República Mexicana. El Dr. José Alejandro Sepúlveda García participa activamente en asesorías en países como CUBA, COSTA RICA, REP. DOMINICANA y en Marzo de 2012 inicia la implementación del programa DISTINTIVO H por parte de la SECRETARIA DE TURISMO en el extranjero y la creación del PROGRAMA PILOTO EN 2010 DE PROVEEDORES H.

1.3 Planteamiento del problema

El laboratorio de calidad Higienyc Sanitary necesita confirmar sus métodos de prueba microbiológicos para cumplir con los requerimientos en el sistema de gestión de calidad, conforme la NMX-EC-17025-IMNC-2006, en la que se establecen los criterios que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración, así también necesita eliminar las no conformidades para cumplir con todos los requisitos de la norma. Dentro de los análisis de calidad realizados se encuentra el grupo *Coliformes totales*, los cuales continúan siendo el indicador de elección que manifiesta contaminación fecal reciente o condiciones higiénicas inadecuadas. Este grupo de bacterias es de gran importancia como indicadores de la calidad sanitaria en el procesamiento de alimentos, por tal razón la demanda de los hoteles por cumplir con estos análisis de calidad se vuelve cada vez mayor, por lo que el laboratorio Higienyc Sanitary debe asegurar la veracidad de sus resultados ante las crecientes demandas, debido a esto se hace necesario la adopción de organismos normativos actualizados que presenten las competencias y métodos adecuados para la realización de ensayos. Se trabajará en la confirmación del método microbiológico de recuento en placa para Coliformes totales en muestras de leche pasteurizada. Dichos métodos se confirmarán con procedimientos de mediada y análisis conforme la NOM-242-SSA1-2009, así también para establecer los lineamientos y criterios necesarios del protocolo de confirmación y documentación de las técnicas se utilizara la guía para evaluación de desempeño de métodos de pruebas microbiológicas CCAYAC-P-062, con la finalidad de comprobar el correcto funcionamiento de los métodos en el laboratorio de análisis microbiológicos Higienyc Sanitary.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Confirmación del procedimiento de cuantificación de *Coliformes totales* para cumplir con los requerimientos especificados en la NMX-EC-17025-IMNC-2006.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Realizar una evaluación del cumplimiento de la ISO-EC-17025-2006 en el proceso de análisis del método en el laboratorio, para eliminar las no conformidades dentro del área de microbiología.
- Desarrollar un protocolo de confirmación del método de análisis mediante la norma CCAYAC-P-062.
- Evaluar el parámetro de repetibilidad de la técnica de recuento en placa en muestras de leche mediante 9 repeticiones sucesivas realizadas en las mismas condiciones de medición.
- Evaluar el parámetro de reproducibilidad de la técnica de recuento en placa en muestras de leche mediante 9 repeticiones sucesivas realizadas en diferentes condiciones de medición.
- Evaluar los parámetros estadísticos obtenidos de la confirmación de la técnica de recuento en placa, mediante lo establecido en la norma CCAYAC-P-062.
- Elaborar un protocolo de resultados para verificar el cumplimiento del método utilizado mediante lo establecido en la norma CCAYAC-P-062.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Acreditación

Acreditación es el acto por el cual una entidad de acreditación reconoce la competencia técnica y confiabilidad de los organismos de certificación, de los laboratorios de ensayo (prueba), de los laboratorios de calibración y/o de las unidades de verificación (organismos de inspección) para la evaluación de la conformidad. De acuerdo a la norma NMX-EC-17011-IMNC-2005, acreditación es la atestación de tercera parte relativa a un organismo de evaluación de la conformidad (OEC) que manifiesta la demostración formal de su competencia para llevar a cabo tareas específicas de evaluación de la conformidad. (LFMN Y 17011)

2.2 Norma ISO/IEC 17025

Es una normativa internacional desarrollada por la Organización Internacional de Normalización (ISO) en la que se establecen los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración. Se trata de una norma de calidad que tiene base en la serie de normas ISO 9000, aunque introduce una serie de requisitos técnicos imprescindibles para lograr la acreditación de los laboratorios de ensayo y calibración. La norma ISO/IEC 17025 es aplicada por los laboratorios de ensayo y calibración con el objetivo de demostrar que son técnicamente competentes y que sus resultados son veraces. Los laboratorios de ensayo y/o prueba demuestran su competencia técnica, asegurando la calidad de los informes de resultados que emiten a través la comprobación del cumplimiento con los requisitos sobre estructura y organización, ética e imparcialidad, sistema de gestión de la calidad, personal, equipo, procedimientos técnicos, validación de métodos, calibración, trazabilidad, etc., establecidos en la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006/ISO 17025:2005. (“EMA”, 28 de febrero de 2017)

La norma ISO-17025 propone una serie de requisitos para laboratorios interesados en demostrar que están operando de acuerdo con los requerimientos establecidos por este documento. (ISO/IEC 17025:2005).

2.3 Validación:

Proceso por el cual se establece por estudios de laboratorio que el método por sus características de desempeño cumple con los requerimientos que se pretenden para el método. Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido requisitos para una utilización o aplicación específica, es una herramienta usada para proporcionar las evidencias de que un método de ensayo conlleva a resultados confiables y adecuados a la calidad y finalidad pretendidas”. Para microbiología “El que se refiere a detectar o cuantificar un microorganismo especificado, o un grupo microbiano, con precisión y exactitud adecuadas” (ISO/TR 13843:2000).

Una validación aplica cuando se crea un método de medida y sirve para demostrar que cumple con los requisitos para los cuales se requiere. También aplica cuando un método de medida, ya validado, se modifica. Conceptualmente el diseño de un método de medida parte de una serie de requisitos que deben ser cumplidos.

2.3.1 Validación primaria:

La validación primaria es un proceso exploratorio que tiene la meta de establecer los límites operacionales y 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. Característicamente, la validación primaria procede mediante el uso de esquemas de ensayo especialmente diseñados. Los laboratorios que desarrollan un método o una variante de una norma existente deben realizar los pasos de la validación primaria (GTC 94, 2003).

2.3.2 Validación secundaria:

Demostración por experimento que un método establecido funciona de acuerdo con las especificaciones en las manos del usuario. Suele llamarse verificación y es la confirmación, mediante el aporte de pruebas objetivas, que se han cumplido los requisitos establecidos (ISO

9000:2000). La validación secundaria tiene lugar cuando un laboratorio procede a implementar un método desarrollado en otra parte. Se centra en la reunión de evidencia acerca de que el laboratorio está en capacidad de cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria.

Es importante para los laboratorios de análisis, validar sus técnicas para así optimizar sus procesos, lo cual implica reducir sus gastos, el tiempo de desarrollo de la técnica y generar confiabilidad en los resultados que se emiten. Así mismo sirve para dar cumplimiento a las normas legales pertinentes o al logro del cumplimiento de normas que, aunque no son de obligatorio acatamiento contribuyen a la credibilidad del laboratorio y a obtener altos niveles de calidad que generen confianza dentro de sus clientes (PDA suggested revisión, 2000).

2.3.3 Conformación

Esta aplica para demostrar que un método de medida ya validado ha sido implementado de inicio en laboratorio o en campo conforme los requisitos y características establecidas en la validación. Es una prueba inicial cuando se implementa un método ya validado, el laboratorio adquiere la responsabilidad de demostrar que el procedimiento y los errores de las medidas que realiza están conforme a lo descrito y establecido en el método.

Para esto debe considerar lo siguiente:

- Contar con instalaciones y áreas de trabajo conforme el método.
- Contar con equipos e instrumentos cuyas características cumplan con lo indicado en el método.
- Asegurar que las condiciones ambientales cumplan los requisitos del método.
- Cumplir con la trazabilidad metrológica establecida en el método.
- Etc.

La confirmación sirve para asegurar que el comportamiento del método implementado por primera vez cumple con lo establecido. La confirmación se realiza en las siguientes situaciones:

- Cuando por primera vez se establece un método de medida normalizado en un laboratorio.
- Cuando se adquiere un nuevo equipo o instrumento que sustituye a uno en uso y puede afectar el desempeño de las mediciones o ensayos.
- Cuando se tenga duda de los resultados.
- Por aseguramiento de la calidad de las mediciones.

2.4 Método de recuento en placa para *Coliformes Totales*

El método de recuento en placa en general es el mismo para algunas normas o procedimientos como es el caso de la NOM-242-SSA1-2009. Esta Norma Oficial Mexicana establece el método microbiológico para determinar el número de microorganismos Coliformes totales presentes en productos alimenticios por medio de la técnica de cuenta en placa. El método permite determinar el número de microorganismos Coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo Agar-rojo- violeta-bilis-lactosa (RVBA) en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares.

2.5 Definiciones

Medio de cultivo: Agar rojo violeta bilis lactosa (RVBA)

Siembra: Sembrar por duplicado 1 ml de la muestra líquida o 1 ml de la dilución madre en placas estériles. Repetir esta operación con cada una de las diluciones decimales preparadas. Verter 15 ml.

de agar RVBA a 45°C +/- 2 horas. Dejar solidificar. Después volver a verter 4 ml del medio a 45°C +/- 2 horas en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique. Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35°C, durante 24 ± 2 horas.

Recuento: Seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación

debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0,5 a 2,0 mm.

2.5 Grupo *Coliformes*:

El grupo *Coliforme* constituye un grupo heterogéneo con hábitat primordialmente intestinal para la mayoría de las especies que involucra, es constante, abundante y casi exclusivo de la materia fecal, su capacidad de sobrevivencia y multiplicación fuera del intestino también se observa en aguas potables, por lo que este grupo se utiliza como indicador de contaminación fecal del agua. Para su estudio, se dividen en dos grupos. El grupo de bacterias *Coliformes totales* el cual comprende a todos los bacilos Gram-negativos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 hrs a 35 ± 1 °C. Este grupo está conformado por 4 géneros principalmente: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*.

El grupo de *Coliformes fecales*, está constituido por bacterias Gram- negativas capaces de fermentar lactosa con producción de gas a las 48 hrs de incubación a 44.5 ± 0.1 °C. Este grupo no incluye una especie determinada, sin embargo, la más prominente es *Escherichia coli*.

2.5.1 *Escherichia coli* (*E. coli*):

Al microorganismo que está presente en el intestino del hombre y animales de sangre caliente, por lo que su presencia en una muestra de alimento no es deseable ya que indica la presencia de materia fecal. Este microorganismo es miembro de la familia *Enterobacteriaceae*) que incluye diferentes géneros de interés sanitario (*Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*, entre otras). La mayoría de los aislamientos de *E. coli* son considerados como patógenos, aunque pueden causar severas infecciones en personas inmunocomprometidas, en niños pequeños y ancianos. Ciertas cepas al ser ingeridas, pueden causar enfermedades gastrointestinales en individuos sanos. Se considera como un microorganismo común en intestino, pero existen cepas patógenas que afectan al ser humano como el serotipo O157:H7, ocasionando graves cuadros clínicos que pudieran ocasionar la

muerte. Produce ácido en agar que contenga 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D glucuronido y es β -glucuronidasa positivo incubado a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $22\text{h} \pm 2\text{h}$.

Entre los diversos tipos de *E. coli* patógenos podemos diferenciar:

***E. coli* enteropatogénico (EPEP):** Son aquellas cepas asociadas a diarreas infantiles, denominadas a menudo gastroenteritis infantiles (GEI). La EPEP se adhiere a las células de la mucosa del intestino delgado. Sus factores de virulencia favorecen adhesión y en ocasiones penetra a las células mucosas. La infección por EPEP provoca diarrea acuosa generalmente auto limitada, aunque en ocasiones puede ser crónica. Las epidemias causadas por este microorganismo se deben al consumo de agua contaminada y productos cárnicos. En estudios con voluntarios se encontró que la dosis infectiva es de 10^6 microorganismos. La diarrea por EPEP se ha vinculado con múltiples serotipos específicos de *E. coli* los cuales pueden ser identificados mediante la tipificación del antígeno O (somatico) y en ocasiones del antígeno H (flagelar). (Gómez, 1999).

***E. coli* enterotoxigenica: (ETEC):** Son *E. coli* capaces de producir enterotoxinas LT (enterotoxina termolábil), similares a las toxinas del cólera y ST (enterotoxina termoestable), que parece encubrir a un grupo de varias toxinas parecidas. Es reconocida como el agente causal de la diarrea del viajero, la cual se caracteriza por diarreas acuosas con o sin fiebre. La infección puede ser adquirida por el consumo de alimentos tales como vegetales frescos (lechuga en ensaladas) y agua. Este tipo de infecciones es muy frecuente en países subdesarrollados y afecta principalmente a los niños. (Gómez, 1999).

***E. coli* enteroinvasiva (EIEC):** Este microorganismo se encuentra estrechamente relacionado con el género *Shigella*, produce una enfermedad similar a la shigelosis. La enfermedad se presenta comúnmente en niños de países subdesarrollados y en personas que viajan a dichos lugares. La EIEC provoca la enfermedad (diarrea disintérica invasiva) al invadir las células epiteliales de la mucosa intestinal. (Gómez, 1999).

***E. coli* enterohemorrágica (EHEC):** Produce verotoxina, denominada así por su efecto citotóxico sobre las células Vero, una línea de células renales de mono verde africano. La EHEC

se ha asociado con colitis hemorrágica, una variedad grave de diarrea; y con el síndrome urémico hemolítico, enfermedad capaz de producir insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia. La verotoxina tiene propiedades similares a la toxina shiga producida por algunas cepas de *Shigella*. De los tipos serotipos de *E. coli* que producen la verotoxina el más común y el único que puede identificarse en muestras clínicas es el O157:H7. La *E. coli* O157:H7. La causa más común de esta infección es el consumo de carne sin cocinar o poco cocinada. (Gómez, 1999).

2.6 Colonias:

Al agrupamiento de células en forma de masas visibles, en un medio sólido que provienen de una unidad formadora de colonia.

2.7 Dilución decimal:

A la solución, suspensión o emulsión obtenida después de pesar o medir una cantidad del producto bajo examen y mezclarla con una cantidad de nueve veces en proporción de diluyente.

2.8 Diluciones decimales adicionales:

A las suspensiones o soluciones obtenidas al mezclar un determinado volumen de la dilución primaria con un volumen de nueve veces un diluyente y que, por repetición de esta operación con cada dilución así preparada, se obtiene la serie de diluciones decimales adecuadas para la inoculación de medios de cultivo.

2.9 Analito:

En Microbiología, el analito corresponde a una lista de especies taxonómicamente definidas o grupo de microorganismos que se desea cuantificar o detectar.

2.10 Blanco:

Es el alimento a ser usado como matriz, en el cual no fue detectado el analito cuando fue analizado por el método de referencia usado en el laboratorio, en diversas replicas.

2.11 Conjunto de detección:

Combinación de placas o tubos en que es basada la estimación cuantitativa de la concentración microbiana en una muestra. Es el conjunto de las placas o de los tubos utilizados para la estimación numérica de un valor único.

2.12 Matrices:

Son los alimentos o productos representativos de cada categoría seleccionada, utilizados como base para los análisis en el procedimiento de validación.

2.13 Nivel de fortificación:

Es el número de unidades formadoras de colonias adicionado a cada gramo o mililitro de la matriz de alimento. Se determinan a tres niveles de concentración los extremos y un punto medio del trabajo determinado.

2.14 Parámetros de desempeño de confirmación:

Son las propiedades, características o capacidades del método en cuanto al tipo de técnica utilizada:

2.14.1 Sensibilidad:

Capacidad que tiene un método para detectar pequeñas variaciones o cantidades en la concentración de sustancia o cepa de interés = Detectar.

2.14.2- Falso positivo:

Cuando el método alternativo da un resultado positivo sin confirmación y el método de referencia da un resultado negativo. Cuando el resultado verdadero es negativo. Es un resultado presuntivo como positivo porque en la etapa del aislamiento en medios selectivos nos da información como el control positivo, pero se confirma con pruebas bioquímicas que es negativo.

2.14.3 Falso negativo:

Cuando el método alternativo da un resultado negativo sin confirmación y el método de referencia da un resultado positivo. Cuando el resultado verdadero es positivo. Es un resultado presuntivo como negativo porque en la etapa del aislamiento en medios selectivos nos da información como negativo, pero se confirma con pruebas bioquímicas que es positivo.

2.14.4 Límite de detección:

Es el número mínimo de microorganismos que pueden ser detectados por el método, pero en cantidades que no pueden estimarse con precisión. (Aplicado a análisis microbiológicos cualitativos). Los resultados de los análisis cualitativos deben expresarse como: “detectado/no detectado o presencia/ausencia en una cantidad o volumen definidos”.

2.14.5 Límite de cuantificación:

Es la menor concentración de un analito o sustancia en una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones en que se lleva a cabo el método.

2.14.6 Linealidad:

Un incremento del analito en la muestra corresponderá a un incremento lineal o proporcional en el resultado. En términos prácticos, linealidad de un método es la capacidad de respuesta a la concentración del analito de forma proporcional a las diluciones empleadas para su cuantificación.

2.14.7 Coeficiente de Variación (CV):

Desviación estándar relativa para una característica no negativa. Es la relación entre el desvío estándar y la media. El desvío estándar relativo (RSD), cuando se expresa en porcentaje, corresponde al Coeficiente de variación ($CV \% = 100 RSD$).

2.14.8 Desviación estándar:

Medida de la dispersión. Es una medida de la magnitud en que se desvían las diversas puntuaciones obtenidas de su valor medio. Si las puntuaciones se agrupan estrechamente en torno a la media, la DS será relativamente pequeña; si se extienden en todas direcciones, la DS será relativamente grande.

2.14.9 Repetibilidad:

Mide la variabilidad del método analítico en la rutina de trabajo cuando se ejecuta por un solo analista, con un mismo equipo en un período corto de tiempo. Es la clase de variabilidad que se espera entre resultados cuando una muestra se analiza por duplicado. Es la concordancia (aproximación) entre los resultados de medidas sucesivas del mismo mensurando realizado en las mismas condiciones (de repetibilidad – mismo analista, mismos medios, mismos equipos, mismo local, al mismo tiempo).

La repetibilidad es computada como $r = 2.8 S_r$, donde S_r es el desvío estándar de repetibilidad.

2.14.10.- Reproducibilidad:

Expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, cuando el método analítico se aplica en diferentes días y con diferentes analistas. Aproximación del acuerdo entre los resultados de las medidas en el mismo mensurando realizado en condiciones diversas de aquellas cuando se realizó la medida. La reproducibilidad es computada como $R = 2.8 S_R$, donde S_R es el desvío estándar de reproducibilidad, el cual es calculado por la ecuación:

$$S_R = \sqrt{s^2_L + s^2_r}$$

2.14.11 Intervalo de confianza:

Es la probabilidad de que el conjunto de los valores verdaderos de un analito esté contenido en un intervalo de cobertura especificado (intervalo que contiene el conjunto de valores verdaderos de un analito con una probabilidad declarada con base en la información disponible).

2.14.12 Sesgo:

Es la suma de todos los errores sistemáticos inherentes al método, cualquiera que sea el laboratorio que lo usa. Es el error sistemático total de la medida o de su estimado con respecto a un valor de referencia. En la práctica es la diferencia entre el resultado que se puede esperar del teste y un valor de referencia aceptado. Se expresa como la diferencia entre el valor de la media aritmética de la recuperación y el valor verdadero aceptado.

2.14.13 Recuperación:

Termino general para el número estimado de células, o UFC, en una porción de la muestra de prueba, con la comprensión de que hay un número verdadero de partículas (desconocido) del cual 100% o menos “es recuperado” por el detector. Está estrechamente relacionada con los errores sistemáticos.

2.14.14. Incertidumbre:

Es un parámetro único (usualmente una desviación estándar o un intervalo de confianza) que expresa el intervalo de posibles valores sobre la base de los resultados de medición. Su estimación considera todos los efectos reconocidos que influyen en el resultado. Se establece una vez que se ha efectuado la validación parcial del método. Un resultado analítico no puede ser interpretado sin el valor de incertidumbre asociado.

3. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo la confirmación del método fue necesario evaluar los criterios de la ISO-IEC-17025-2006 para la evaluación del desempeño. Primero, se realizó un control de calidad de los medios de cultivo que se utilizaron, la verificación de equipos e instrumentos y una evaluación de las condiciones ambientales del laboratorio.

Para realizar la confirmación del procedimiento de cuantificación de Coliformes totales en placa, se utilizó la NOM-242-SSA1-2009 que permite determinar el número de microorganismos *Coliformes* presentes utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis), así también para establecer los lineamientos y criterios necesarios del protocolo de confirmación y documentación de la técnica se utilizó la guía para evaluación de desempeño de métodos de pruebas microbiológicas CCAYAC-P-062.

La evaluación de repetibilidad se realizó por medio de nueve repeticiones para cada muestra y cada repetición se hizo por duplicado. La reproducibilidad se evaluó por medio de nueve repeticiones para cada muestra, por duplicado, variando las condiciones de realización del método (mismo analista).

Se realizó un cronograma de actividades el cual se presenta en el anexo No 1, el cual permitió comparar los tiempos programados contra el tiempo real en el que se llevaron a cabo las actividades.

El estudio se realizó en las instalaciones del laboratorio Higienyc Sanitary. Ubicado en Cancún, Q. Roo.

3.1 Criterios para la confirmación de métodos de la ISO/IEC-17025-2006.

3.1.1 Control de calidad de los medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para la confirmación pasaron por diferentes controles; Un control de pH a 25°C, un control de esterilidad y un control de eficiencia, en la que se midió la promoción de crecimiento.

- Control de esterilidad: Mediante una selección del medio de cultivo (Agar rojo violeta lactosa) utilizado para la determinación de *Coliformes totales*, se llevó a incubación durante 48 hrs a 35°C, para verificar que no presente crecimiento de ningún tipo en cajas petri. (Allaert & Escóla, 2002).
- Control de pH a 25°C: Se tomó una muestra del medio de cultivo y con un pH-metro se realizó una medición del medio a una temperatura de 25°C. El valor del pH obtenido para los medios de cultivo debe corresponder con el indicado en la ficha técnica del medio, donde se da un intervalo de aceptación de ± 2 (Allaert & Escóla, 2002).

3.3 Control de ambientes:

Empleando la técnica de sedimentación, se colocaron placas de recuento aerobio en mesas de trabajo y cámaras de flujo laminar (después de haber esterilizado las áreas con alcohol isopropílico al 70%), en un periodo de 15 minutos a temperatura ambiente. Se mantuvo encendida la cámara durante el tiempo de exposición de la placa y en las mesas de trabajo el mechero encendido. Posteriormente las cajas se llevaron a incubar a 35 °C \pm 2 °C por 48 horas y a 35 °C \pm 2 °C durante 5 días para hongos y levaduras. Después se realiza el conteo de las colonias por placa. (Este control se llevó durante todas las pruebas realizadas).

Se reportó como número ufc/15 min / 40 cm² para recuento de Mesófilos y ufc/15 min / 60 cm² para recuento de Hongos.

3.4 Tinción de Gram:

Se realizó el control de la cepa de trabajo por el método de Gram para observar la morfología microscópica; primero se prepara el inóculo (Cepa *E.coli*), tomada de un vial puro en congelación, después se inóculo en una concentración conocida en las cajas del medio de cultivo, posteriormente se realizó el recuento de las colonias, revisando las reacciones de la cepa en el medio. Segundo, se realizó la técnica de tinción de Gram que permitió identificar la morfología de las bacterias *E. Coli* con ayuda del microscopio óptico.

3.5 Control de equipos:

Se revisó el historial de los equipos involucrados en el estudio incluyendo certificados de calibración, mantenimiento y registros de uso.

3.6 Desarrollo de procedimiento de confirmación del método microbiológico.

3.6.1 Elaboración de Protocolo

Se elaboró un protocolo, cumpliendo los requisitos mínimos indicados en el (anexo 2), en este se mencionan los parámetros y métodos estadísticos utilizados, además la descripción de las actividades realizadas y la enumeración de los materiales, medios, reactivos y equipos utilizados.

3.6.2 Selección de la matriz

Para la selección de la matriz se propuso la clasificación presente en la tabla No 1, de productos de interés sanitario, basada en la experiencia de la RNLSP y lo señalado en la ISO 16140. Posteriormente se eligió la matriz de leche pasteurizada, ya que este producto puede desarrollar bacterias Coliformes y tiene el alcance de la metodología a evaluar. Después se eligieron las muestras representativas de acuerdo al alcance del método y los resultados esperados.

Tabla 1. Clasificación de los productos de interés sanitario

Grupo de interés	Cárnicos	Aves	Productos de la pesca	Frutas y Vegetales	Productos Lácteos
Tipos de alimentos	Crudos Procesados Congelados Otros	Crudos Procesados Congelados Otros	Crudos Procesados Congelados Secos Otros	Crudos Procesados Congelados Secos Otros	Crudos Procesados Congelados Secos Otros
Ejemplos de matriz	Carne molida Guisados Carne congelada	Pollo Nugets Milanesas de pollo congelado	Moluscos Pescado Filete Camarón	Mango Coctel	Leche Queso Leche de polvo

Fuente: ISO 16140

3.6.3 Preparación del inóculo

Primero se inóculo una colonia tomada a partir de un cultivo puro de la cepa de referencia (*E. coli* ATCC 25922) en 9 mL de agar base sangre inclinado, se incubó a 35 °C +/- 2 °C, Posteriormente se cosechó el crecimiento con 9 mL de agua peptonada, teniendo cuidado de no llevar consigo el agar, se regresó esta suspensión a un tubo estéril a partir del cual se realizarán diluciones seriadas hasta obtener la dilución 10⁻⁸. De las diluciones 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ se inóculo por duplicado en cajas petri un volumen de 1 mL. Se incubaron las placas por 24 h y se seleccionó la dilución de trabajo la cual debía cumplir con las siguientes características:

La dilución primaria 1:10 (25g de muestra + 225 g de diluyente deberá aproximarse a 1000 UFC/ml.

La probabilidad de obtener resultados positivos:

- 10^{-1} entre 10 y 100 UFC/ml (100% positivos).
- 10^{-2} entre 1 y 10 UFC/ml (10 % positivos).
- 10^{-3} entre 1 a 0 UFC/ml (1 % positivos).

3.6.4 Preparación de las muestras

3.6.4.1 Dilución y homogenización de las muestras

- Las muestras se agitaron manualmente antes de iniciar cada una de las pruebas.
- Se verificó que el recipiente de la muestra se encontrara limpio antes de abrirlo.
- Se pesaron las muestras de la matriz utilizada (leche pasteurizada) y se agregaron a recipientes con agua peptonada (obteniendo diluciones de 10^{-1}). Posteriormente se homogeneizaron manualmente.
- Se realizaron diluciones seriadas en base 10 (obteniendo así las diluciones 10^{-2} y 10^{-3}).

3.6.4.2 Fortificación de las muestras

Para el proceso de fortificación, en condiciones asépticas se inocularon las muestras número 2, 3 y 6, con el microorganismo de prueba en una concentración conocida, recordando que en total se realizaron 6 niveles de muestras, de las cuales la 1, 4 y 5 no fueron fortificadas ya que fueron utilizadas solo para determinar el intervalo de confianza para la evaluación de la confirmación.

3.6.4.3 Recuento en placa para *Coliformes totales*

- Luego de realizar las diluciones y la fortificación de las muestras, se tomó 1 mL de la cada dilución y se llevó a cajas petri estériles, realizando este procedimiento por duplicado en nueve repeticiones, en cualquiera de los 6 casos expuestos a estudiar.
- Se vertió en las cajas petri que contienen la muestra aproximadamente 15 a 20 mL de agar rojo violeta bilis lactosa, que se encontraba a una temperatura de 45°C aproximadamente.

- Se mezcló cuidadosamente la muestra con seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada.
- Después de que esta el medio solidificado en la caja. Verter aproximadamente 4 ml del medio RVBA a $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ en la superficie del medio inoculado.
- Una vez solidificado el medio se invirtieron las cajas y se llevaron a incubar 35°C , durante 24 ± 2 horas.

3.6.5 Ejecución del protocolo

Siguiendo el método de prueba, se analizaron las muestras el número de veces que corresponde, según los criterios de aceptación para métodos cuantitativos presentes en la tabla No 2.

Tabla 2. Criterios de aceptación para métodos cuantitativos

Parámetro	Criterio de aceptación métodos cuantitativos	
Repetibilidad	Muestras no contaminadas Numero de repeticiones: 9 Numero de analistas: 1 Nivel de fortificación: aprox 1000 UFC/mL Resultado R< 3	Muestras naturalmente contaminadas Numero de repeticiones: 9 Numero de analistas: 1 Nivel de fortificación: no aplica Resultado R<3
Reproducibilidad	Numero de repeticiones: 9 Numero de analistas: por lo menos 2 Nivel de fortificación: aprox 1000 UFC/mL Resultado R< 3	Numero de repeticiones: 9 Numero de analistas: por lo menos 2 Nivel de fortificación: no aplica Resultado R< 3
Recuperación	Solo muestras contaminadas Numero de repeticiones: 9 Numero de analistas: 1 Nivel de fortificación: aprox 1000 UFC/mL Resultado: Entre el 90 y 110% log	
Sesgo	Solo muestras contaminadas Numero de repeticiones: 9 Numero de analistas: 1 Nivel de fortificación: aprox 1000 UFC/mL Resultado: La diferencia absoluta de lo recuperado y lo inoculado es <0.3 log	

Fuente: CCAYAC-P-062-1.

3.6.5.1 Niveles de inóculo

- Muestra sin inocular. Verificación de muestra (blanco).
- Muestra inoculada con aproximadamente 1000 UFC/ml.

3.6.5.2 Criterios de aceptación para muestras

Para determinar si el método cumple con la probabilidad de que el 95% de las muestras caen en el intervalo de confianza manejado en la norma CCAYAC-P-062-1: fue tomada como

referencia la inoculación de una muestra sin matriz del alimento con el microorganismo positivo previamente estandarizado. Según tablas de resultados de la muestra 3.

3.6.6 Cálculos

3.6.6.1 Repetibilidad:

Para la evaluación de la repetibilidad, se realizaron las respectivas pruebas bajo las mismas condiciones, en un mismo alimento, para evaluar el grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo elemento, en nueve repeticiones por duplicado de cada una de las 6 muestras presentadas. Para calcular el logaritmo del resultado obtenido en las tablas correspondientes en los resultados, tomadas del método de prueba a evaluar. Primero se calculó el promedio que se expresó como la suma de los logaritmos entre el número de muestras:

$$X = \frac{\Sigma \log}{n}$$

Posteriormente se calcula la desviación estándar:

- 1) primero calculamos el valor medio;
- 2) hallamos las diferencias entre los valores observados y el valor medio;
- 3) elevamos al cuadrado estas diferencias y las sumamos;
- 4) dividimos el resultado entre el número de elementos de los que hemos obtenido una medida, y, finalmente, extraemos la raíz cuadrada.

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{n-1 grados de libertad}$$

Para obtener el coeficiente de variación;

$$C.V = \frac{\text{Desviación estandar}}{\text{Promedio}}$$

Por último, utilizando los valores anteriores se utilizó la siguiente formula:

$$r = C.V * 2.8$$

La repetibilidad es computada como $r = 2.8 S_r$, donde S_r es el desvío estándar de repetibilidad. Los datos que se utilizaron en los cálculos son los obtenidos de la serie de diluciones del nivel de fortificación de la mayor cantidad de microorganismos.

3.6.6.2 Reproducibilidad:

Para la evaluación de la reproducibilidad, se realizaron las respectivas pruebas variando las condiciones de realización del método (hora de realización), en el mismo alimento, para evaluar el grado de concordancia entre los resultados de las mediciones en el mismo elemento bajo condiciones de medición diferentes o alteradas. Esta se aplicó a las muestras 5 y 6 en tres diferentes horas 9:00 a.m, 1: 00 p.m y 5:00 pm, por duplicado.

Utilizando el método de referencia, se consideró como repetibilidad las actividades realizadas por el mismo analista en diferentes días. Los datos que se utilizan en los cálculos son los obtenidos de la serie de diluciones del nivel de fortificación de la mayor cantidad de microorganismos.

$$R = C.V \text{ de promedios} * 2.8$$

3.6.6.3 Recuperación:

Con los datos obtenidos de la repetibilidad en muestras fortificadas se calculó la cantidad de UFC, en cada repetición y se calculó el logaritmo de cada cuenta, después se promediaron los logaritmos. También se calculó el logaritmo del inoculo verificado.

Finalmente, el cálculo % de recuperación:

$$\% \text{ recuperación} = \frac{\text{Media de la cuenta de logaritmo de las cuentas} \times 100}{\text{Logaritmo de las UFC inoculadas}}$$

3.6.6.4 Sesgo:

En la práctica es la diferencia del resultado recuperado con respecto al resultado esperado. A partir de los cálculos de recuperación; se calculó la diferencia de la media de los logaritmos de las cuentas menos el logaritmo del inóculo utilizado.

$$\text{Sesgo} = (Ve - Vo)$$

Donde:

Ve= valor esperado

Vo= valor verdadero

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Control de calidad de los medios de cultivo

En microbiología uno de los métodos más importantes y utilizados para la identificación de microorganismos consiste en observar el crecimiento de dichos microorganismos en medios de cultivo los cuales como su nombre lo indica son una solución de nutrientes con un pH adecuado que favorece el desarrollo y factores de crecimiento que permite la multiplicación de microorganismos.

Para que los microorganismos crezcan adecuadamente en un medio de cultivo se deben cumplir una serie de condiciones como lo son: temperatura, grado de humedad, disponibilidad de oxígeno, así como un pH adecuado. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante, ya que de la inocuidad y de la capacidad del medio de promover el crecimiento de los microorganismos va a depender un buen resultado en el análisis microbiológico (Lighthfood, 2002).

El control de la calidad en la preparación y evaluación de los medios de cultivo es considerado como una parte esencial y buena práctica de laboratorio, la cual es necesaria para mantener el nivel y la ejecución de cualquier técnica microbiológica.

Control de esterilidad: Para la esterilización de los medio se empleó un autoclave, los medios se prepararon y se esterilizaron a 121°C/ 15 min, Se tomó el medio de cultivo utilizado en el laboratorio para la determinación de Coliformes totales, con número de lote 5273879 y se preparó una cantidad de 200 mL, después se diluyó en cajas petri alrededor de 15 a 20 mL de agar y se llevaron a incubación durante 48 hrs a 35 +/- .2 °C. Posteriormente se observó y se comprobó la esterilidad ya que no tuvo crecimiento de ningún microorganismo en las cajas petri del medio de cultivo, permitiendo utilizar satisfactoriamente las cajas petri con el medio de cultivo. Este control se realizó cada vez que se prepararon medios para correr las pruebas de la conformación del método microbiológico.

Control de pH a 25°C: El control del pH de los medios de cultivo preparados antes y después de su esterilización es esencial, para esto se preparó una muestra del medio de cultivo, con un pH-metro se realizó una medición del medio antes de esterilizar, en la cual se utilizó una solución de hidróxido de sodio al 1,0 N, para ajustar el pH hasta pH 7.5. El valor obtenido se encuentra dentro del rango establecido en la ficha técnica del medio, donde se da un intervalo de aceptación de 7.4 ± 0.2 , pero debido al proceso de esterilización, se sabe por experiencia que el pH del medio baja debido a la acción de la temperatura. Por lo cual se aseguró de ajustar el pH del medio hasta el límite establecido en la ficha técnica. Después se llevó a esterilización en autoclave durante 15 minutos a $121^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$. Por último, se tomó el pH después de la esterilización. El valor obtenido para el medio de cultivo (agar rojo violeta bilis lactosa) con número de lote 5273874, fue de pH 7.2, el cual corresponde al indicado en la ficha técnica.

4.2 Control de ambientes:

Para llevar a cabo el control de ambientes, se empleó la técnica de vertido en placa, colocando las placas abiertas con medio de cultivo para microorganismos mesófilos en mesa de trabajo y campana de flujo laminar, durante el proceso de confirmación, es decir durante todas las pruebas, el recuento obtenido de los ambientes fue el siguiente (tabla No 3). En la figura No 1, se muestra el crecimiento nulo en las mediciones de esterilidad de ambiente.

Tabla 3. Recuento del control de ambientes

Prueba	Mesófilos UFC/ exposición 15 min.	Hongos y levaduras UFC/ exposición 15 min.
Control de calidad de medios de cultivo	0	0
Prueba de repetibilidad	0	0
Prueba de reproducibilidad (diferentes horas)		
9:00 a.m.	0	0
1:00 p.m.	0	0
5:00 p.m.	0	0

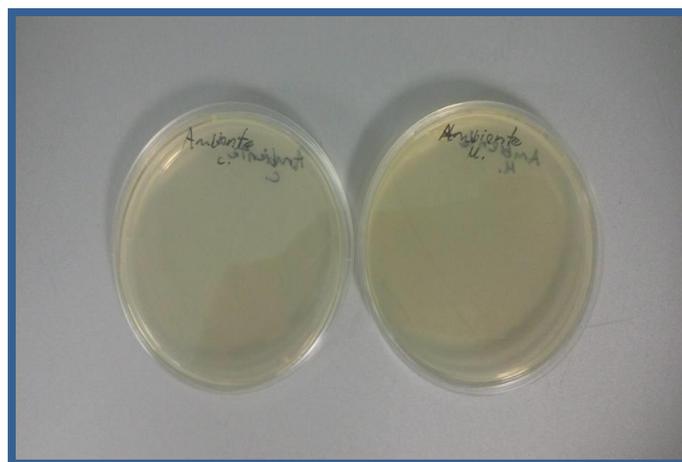


Figura 1. Placas de control de ambientes sin crecimiento

Los resultados obtenidos para el control de ambientes los distintos puntos del laboratorio (mesa de trabajo y campana de flujo laminar) indican la baja carga de microorganismos en el ambiente, lo que permitió deducir que se realizó una correcta limpieza de esta área, que no permite la proliferación de microorganismos en el ambiente que pudieran aportar contaminación a las pruebas realizadas.

4.3 Tinción de Gram

Para el aislamiento e identificación de bacterias a partir de su hábitat, se utiliza una gran variedad de medios de cultivo, que de acuerdo con su composición nutricional se conocen como medios simples, enriquecidos, diferenciales, selectivos, donde cada microorganismo desarrolla una morfología colonial que permite su identificación.

Mediante la observación microscópica de preparaciones en fresco o frotis teñidos con una tinción simple o diferencial, se pueden poner de manifiesto estructuras como flagelos, esporas, capsula, pared celular, gránulos metabólicos, etc. En microbiología, la tinción de Gram es la más empleada en el estudio de la morfología de bacterias, ya que estas son clasificadas según su reacción a los colorantes de esta técnica.

En el ensayo de repetibilidad de la muestra 2 se obtuvo un notable crecimiento de *Coliformes totales*, el cual fue aislado a partir de una muestra de leche y se evidenció la morfología típica de las colonias de este microorganismo, que posteriormente se confirmó mediante la coloración Gram, en donde se obtuvieron los bacilos Gram negativos, confirmando así la morfología del microorganismo aislado (figura No 2).

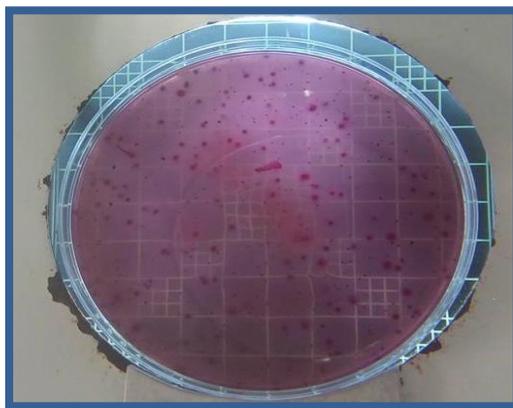


Figura 2. *Coliformes totales* en muestra de leche. Prueba de repetibilidad

4.4 Control de equipos

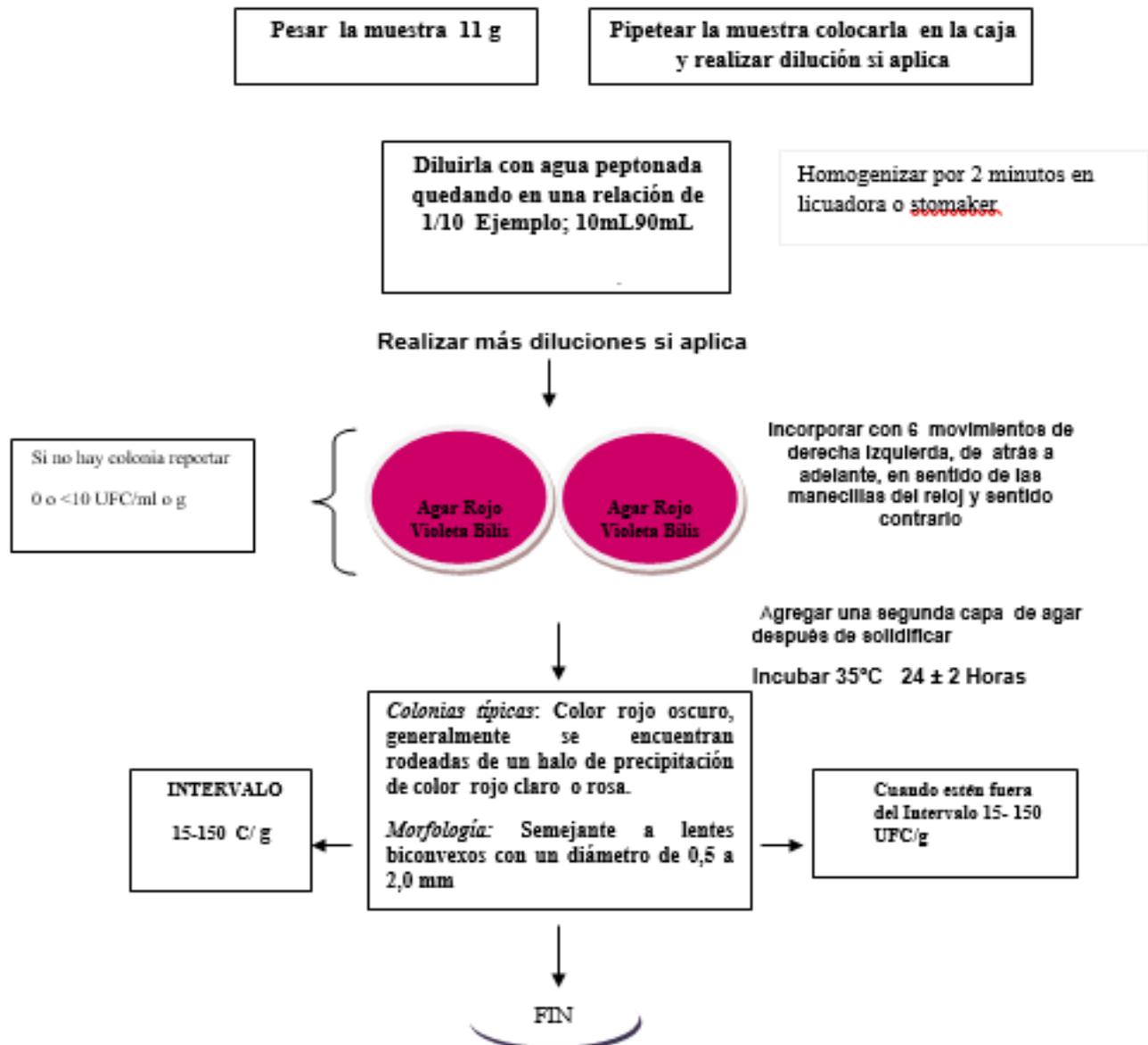
Para el presente estudio es de relevancia considerar que los instrumentos y equipos de medida utilizados a diario en el laboratorio lleven a cabo el debido mantenimiento y calibración, y que tengan un efecto sobre la exactitud o validez de los ensayos. Es importante que el laboratorio emplee métodos y procedimientos apropiados para todos los ensayos y/o calibraciones, ya que debe equiparse con todos los elementos que garanticen un margen de trazabilidad de las medidas que se realizan durante su utilización dentro de la ejecución del análisis o método microbiológico y así avalar los resultados de las pruebas (Romero, 2005 y Soler, 2006).

Al inicio del proceso de confirmación para el método de recuento en placa de Coliformes totales, se verificó el procedimiento de mantenimiento y calibración de los equipos a utilizar en el proceso. Se revisó que todos los procedimientos y formatos de calibración estuvieran en orden.

Como resultado se observó que el laboratorio cuenta con certificados de calibración de los instrumentos de medida para el análisis del método, algunos de estos son; marco de pesas (cilíndricas y laminares), balanza eléctrica, pipetas unicanales de volumen variable, manómetros analógicos, termómetros líquidos de vidrio, entre otros. En dichos certificados se especifican los patrones empleados, las condiciones ambientales de calibración y las condiciones de incertidumbre, y de los cuales se cumple con los requisitos de competencia técnica exigida por la norma ISO/EC 17025-2005. Por último, se identificaron y registraron todos los instrumentos de medida de acuerdo a la frecuencia de mantenimiento y calibración. Al final se entregó el reporte de calibración con trazabilidad metrológica. La verificación se realizaba antes y después de utilizar el equipo, por el químico analista, así mismo se calibraban las balanzas analíticas con marco de pesas al inicio del proceso, en las cuales el grado de error o desviación máximo era de 0.1gr.

4.5 Protocolo para la cuenta de microorganismos *Coliformes totales* en placa

4.5.1 Método de ensayo:



4.5.2 Equipos utilizados:

Figura 3. Diagrama de flujo del método para la determinación de Coliformes totales

- Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.
- Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de $0,1^{\circ}$ C y que mantenga la temperatura a $45 \pm 1,0^{\circ}$ C.
- Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).
- Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.
- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0^{\circ}$ C, provista con termómetro calibrado.
- Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.
- Registrador mecánico.
- Microscopio óptico.
- Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25° C.

4.5.3 Materiales utilizados:

- Pipetas bacteriológicas calibradas de 10 y 5
- Pipetas de 1 ml, graduaciones de 0,1 mL
- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.
- Tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca.
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.
- Cajas Petri desechables.
- Rejillas para tubos de ensaye.
- Asa de platino de aproximadamente 3 mm de diámetro.

4.5.4 Reactivos y medios utilizados:

A continuación, se muestran los medios de cultivo empleados en el proceso de la confirmación del método en la tabla No 4.

Tabla 4. Medios y reactivos utilizados en el método de confirmación

Medio de cultivo y reactivos	Marca
Agar base sangre	Dibico/Difco
Caldo Infusión Cerebro Corazón	Dibico/Difco
Agar Rojo Violeta Bilis Lactosa (RVBA)	Dibico/Difco
Hidróxido de sodio al 0.1 N	Dibico/Difco
Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)	Control Técnico y Representaciones
Agua peptonada	Control Técnico y Representaciones

4.5.5 Cepas utilizadas:

Se utilizaron dos cepas control que se mantuvieron en congelación a -20 °C. Dichas cepas se describen en la tabla No 5.

Tabla 5. Cepas de control de la familia *Enterobacteriaceae*

CEPAS	Procedencia	Código interno
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	001
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	002

4.5.6 Matriz

La norma ccayac-P-062-1 clasifica la matriz en diferentes grupos, el matriz objeto de estudio se clasifica como a continuación se indica en la tabla No 6.

Tabla 6. Características de la matriz

Generalidades	Muestra
Grupo de interés	Producto lácteo
Tipo de alimento	Procesado
Matriz	Leche pasteurizada
Forma de almacenamiento:	Refrigeración a 4°C
Marca:	Alpura
Presentación:	Envase tetra pak de 1 L
Cantidad utilizada:	1 L
Caducidad:	17-jun-2017

4.6 Selección de la matriz

Para llevar a cabo la confirmación de los métodos se procesó la matriz de leche pasteurizada, ya que este producto puede desarrollar bacterias *Coliformes*, también asegura ser una muestra no contaminada por su proceso de elaboración y envasado. Por esta razón el producto tiene el alcance de la metodología a evaluar.

Antes del inicio del proceso de confirmación las muestras de leche fueron codificadas numéricamente y esterilizadas en autoclave a 121 °C durante 15 minutos para eliminar la flora microbiana natural y conocer con exactitud el número de microorganismos inoculados; hasta su utilización fueron conservadas a -20 °C. La tabla muestra el tipo de matriz y el número de codificación.

4.7 Preparación del inóculo

El inóculo se preparó usando la cepa de *E. coli* ATCC 25922 la cual se encontraba en un vial en congelación -20°C .

4.7.1 Activación de la cepa de trabajo

Para realizar la activación de la cepa de trabajo se realizaron los siguientes pasos;

1. Se tomaron 4 tubos con agar base sangre inclinado y se rotularon con el nombre de las dos cepas de trabajo, fecha de siembra y nombre de analista, posteriormente;
2. Se transfirió la bacteria con un asa estéril, tomada a partir del vial o cultivo puro del microorganismo, por medio de un estriado, en 9 ml del agar base sangre inclinado y se incubó a 35°C durante 18 a 24 horas. La figura No 4 muestra el crecimiento de las cepas de referencia en los tubos de agar sangre.
3. Posteriormente se cosechó el crecimiento con 9 ml de agua peptonada, teniendo cuidado de no llevar consigo el agar.
4. Se regresó esta suspensión a un tubo estéril a partir del cual se realizarán diluciones seriadas hasta obtener la dilución 10^{-8} . La figura No 5 muestra los tubos con las diluciones decimales realizadas de la cepa de referencia.
5. De las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} , se transfirió por duplicado un mililitro a cajas petri y se adicionó agar cuenta estándar, así mismo se preparó una caja control con 15 ml de medio para verificar la esterilidad, después se llevaron a incubar a 35°C durante 18 a 24 horas. La tabla No 7 y figura No 6 muestran el crecimiento bacteriano obtenido en las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} .

Tabla 7. Crecimiento bacteriano en placas de agar cuenta estándar

Dilución	Placa 1	Placa 2	Promedio	Cuenta
10^{-5}	1560	1540	1550	1600 UFC
10^{-6}	155	159	157	160 UFC
10^{-7}	92	98	115	120 UFC
10^{-8}	6	4	5	5 UFC

La figura No 4 muestra el crecimiento de las cepas de referencia en los tubos de agar sangre.

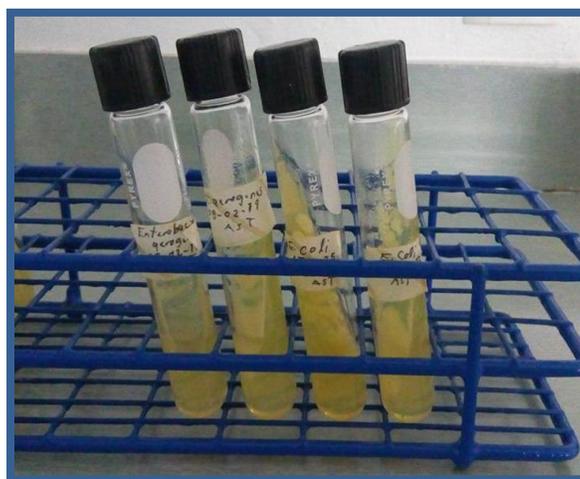


Figura 4. Crecimiento de cepas *E. coli* en agar base sangre

La figura No 5 muestra los tubos con las diluciones decimales realizadas de la cepa de referencia.



Figura 5. Diluciones decimales de cepa *E. coli*

La figura No 6 muestra el crecimiento bacteriano obtenido en las diluciones 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ en agar cuenta estándar.

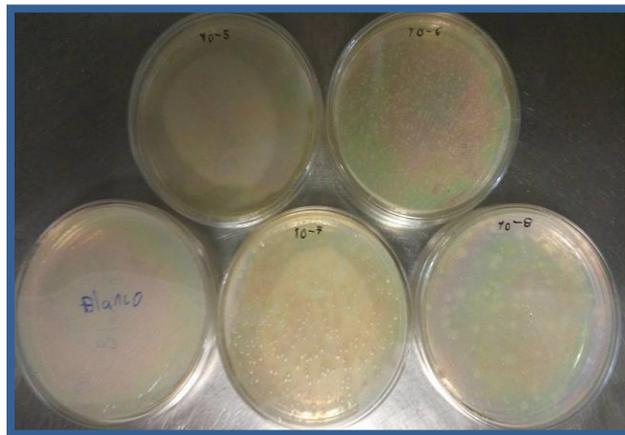


Figura 6. Crecimiento de *E. coli* en placas

4.7.2 Selección de la dilución de trabajo

Se realizaron los cálculos para determinar el tamaño del inóculo a utilizar, siguiendo el método comúnmente utilizado por el laboratorio y a partir de este se seleccionó la dilución 10^{-5} /aproximadamente 1600 UFC. Dicha dilución fue seleccionada por ser la más aproximada a obtener resultados positivos;

La dilución primaria 1:10 (10 mL de muestra + 90 mL de diluyente deberá aproximarse a 1600 UFC/mL).

La probabilidad de obtener resultados positivos:

- 10^{-1} entre 60 y 160 UFC/ mL (100% positivos).
- 10^{-2} entre 1 y 16 UFC/ mL (10 % positivos).
- 10^{-3} entre 0 y 1 UFC/mL (1 % positivos).

4.8 Preparación de muestras

La preparación de las muestras se realizó de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994 "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".

Fortificación de las muestras:

Para iniciar el análisis de confirmación primero se obtuvo la concentración del analito a inocular en las blancos o alimentos usados como matriz. Posteriormente se inocularon las muestras correspondientes:

1.-Muestra sin inocular:

En esta muestra solo se encuentran 10mL del alimento (leche) con 90 mL de agua peptonada, sin el analito de interés. Luego de realizar las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), se tomó 1mL de cada dilución y se llevó a cajas petri estériles, realizando este procedimiento por duplicado en 9 repeticiones.

2.- Muestra inoculada con aproximadamente 1600 UFC/mL.

En esta muestra se encuentran 10mL del alimento (leche) con 90 mL de agua peptonada y el analito de interés en concentración conocida. Luego de realizar las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), se tomó 1mL de cada dilución y se llevó a cajas petri estériles, realizando este procedimiento por duplicado en 9 repeticiones.

3.- Diluyente inoculado con aproximadamente 1600 UFC/mL.

Esta muestra se encuentra con 90 mL de agua peptonada y el analito de interés en concentración conocida. Luego de realizar las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), se tomó 1mL de cada dilución y se llevó a cajas petri estériles, realizando este procedimiento por duplicado en 9 repeticiones.

4.- Diluyente de agua peptonada como muestra testigo de esterilidad

Esta muestra se encuentra solo con 90 mL de agua peptonada, debido a que se utilizara como el blanco del análisis. Luego de realizar las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), se tomó 1mL de cada dilución y se llevó a cajas petri estériles, realizando este procedimiento por duplicado en 2 repeticiones.

5.-Muestra sin inocular para reproducibilidad:

En esta muestra solo se encuentran 10mL del alimento (leche) con 90 mL de agua peptonada, sin el analito de interés. Luego de realizar las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), se tomó 1mL de cada dilución y se llevó a cajas petri estériles, realizando este procedimiento por duplicado en 9 repeticiones.

6.- Muestra inocula para reproducibilidad:

En esta muestra se encuentran 10mL del alimento (leche) con 90 mL de agua peptonada y el analito de interés en concentración conocida. Luego de realizar las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), se tomó 1mL de cada dilución y se llevó a cajas petri estériles, realizando este procedimiento por duplicado en 9 repeticiones.

4.9 Ejecución del protocolo

Siguiendo el método establecido para la ejecución de la confirmación se realizaron 4 niveles de prueba para la evaluar la repetibilidad del método de recuenta en placa para Coliformes totales y también se realizaron 2 niveles de prueba para el análisis de reproducibilidad.

4.8.1 Repetibilidad

- Muestra 1 sin inocular.
- Muestra 2 inoculada con aproximadamente 1600 UFC/ml.
- Muestra 3 diluyente inoculado con aproximadamente 1600 UFC/ml.
- Muestra 4 diluyente de agua peptonada (blanco).

4.8.2 Reproducibilidad

- Muestra 5 sin inocular.
- Muestra 6 inoculada con aproximadamente 1600 UFC/ml.

4.10 Cálculos

La confirmación de métodos dentro de un proceso de acreditación, es de vital importancia, ya que, mediante la utilización de técnicas validadas, se está dando la seguridad y confianza en los resultados que dichos análisis arrojan dentro del laboratorio. Dicha confirmación se centra en reunir evidencias para dar reconocimiento al laboratorio en cuanto a la capacidad de realizar métodos y a cumplir con las especificaciones que estos procedimientos tienen establecidos. Para llevar a cabo el proceso de confirmación se evaluaron los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad de la técnica de recuento en placa en alimentos de Coliformes Totales, la cual se realiza a diario en el laboratorio por ser el grupo de microorganismos más ampliamente utilizado en microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas.

Para la evaluación de la repetibilidad, se realizaron las respectivas pruebas bajo las mismas condiciones, en un mismo alimento, para evaluar el grado de concordancia entre los

resultados de mediciones sucesivas del mismo elemento. Para la evaluación de la reproducibilidad, se realizaron las respectivas pruebas variando las condiciones de realización del método (hora de realización), en el mismo alimento, para evaluar el grado de concordancia entre los resultados de las mediciones en el mismo elemento bajo condiciones de medición diferentes o alteradas. Para reconocer el grado de concordancia de los métodos validados, se llevó a cabo el estudio mediante estadística deductiva en la que se evaluó tanto la repetibilidad como la reproducibilidad de la técnica y esto se realizó mediante el análisis del coeficiente de variación y el análisis de varianza. Por medio de índices de naturaleza estadística es posible determinar el grado de concordancia de las mediciones, si tales mediciones se realizan por medio de una variable de naturaleza cuantitativa, una medida de dicha variabilidad es la desviación estándar de las mismas. Tal medida es de difícil interpretación cuando carece de un punto de referencia, por tal razón es preferible obtener el valor de la desviación estándar en relación con la medida de las observaciones. El coeficiente de variación es entonces el resultado que se obtiene de dividir la desviación estándar por la media y multiplicarlo por 100. Un coeficiente de variación inferior al 20% revela una buena concordancia de las mediciones obtenidas mediante una técnica específica.

Los resultados realizados, fueron expresados mediante lo descrito por la NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aeróbicas en placa.

Donde especifica lo siguiente:

Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por mililitro o gramo de la muestra. Redondear la cifra obtenida en la cuenta de manera que sólo aparezcan dos dígitos significativos al inicio de esta cifra. Para redondear, elevar el segundo dígito al número inmediato superior cuando el tercer dígito de la derecha sea cinco o mayor (por ejemplo: 128 redondear a 130). Si el tercer dígito es cuatro o menos, reemplazar el tercer dígito con cero y el segundo dígito mantenerlo igual (Por ejemplo: 2417 a 2400).

4.10.1 Ensayos de confirmación del método de recuento en placa para *Coliformes totales* en muestras de leche

El recuento de Coliformes totales en alimentos tiene por objetivo identificar la calidad higiénica en el proceso de producción, la presencia de este grupo de microorganismos es signo de mala calidad higiénica la cual se puede deber a contaminación por manipuladores, equipos, calidad del agua, etc. Es importante detectar la presencia y número de Coliformes que hay en alimentos, ya que algunos de estos pueden ser patógenos y causar enfermedades de tipo gastrointestinal.

4.10.1.1 Ensayos de repetibilidad de *Coliformes totales*

Muestra 1

Ensayo de repetibilidad de Coliformes totales en muestra que presenta; 10 mL de la matriz de leche pasteurizada y 90 mL de solución diluyente (agua peptonada). Se calcularon las unidades formadoras de colonias en nueve repeticiones por duplicado y se obtuvieron los siguientes resultados presentes en la tabla No 8.

Tabla 8. Resultados de recuento en placa para *Coliformes totales* de la muestra numero 1 ensayo de repetibilidad

Repetición	Placa 1	Placa 2	Promedio	Cuenta	Resultado
1	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
2	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
3	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
4	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
5	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
6	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
7	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
8	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
9	0	0	0	0	< 10 UFC/ml

Para llevar a cabo las prueba de evaluación del parámetro de repetibilidad en la técnica de recuento en placa de *Coliformes totales* se realizó el ensayo con una muestra de leche pasteurizada, en donde no se encontró crecimiento alguno de *C. totales*, lo cual confirma lo que se esperaba en la muestra, ya que este microorganismo no debe encontrarse en este tipo de alimento, pues su presencia indica puntos críticos de contaminación que pueden ir desde las materias primas que fueron utilizadas, hasta errores en el proceso de cocción, un tratamiento insuficiente o un almacenamiento prolongado sin refrigeración.

Se presentaron datos homogéneos para las pruebas realizadas y la evaluación de los parámetros establecidos, en la que la constante fue la obtención en cada repetición de 0 UFC en la muestra numero 1 (figura No 6) y un resultado de <10 UFC/ml de *Coliformes totales* en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35°C durante 24 ± 2 h.

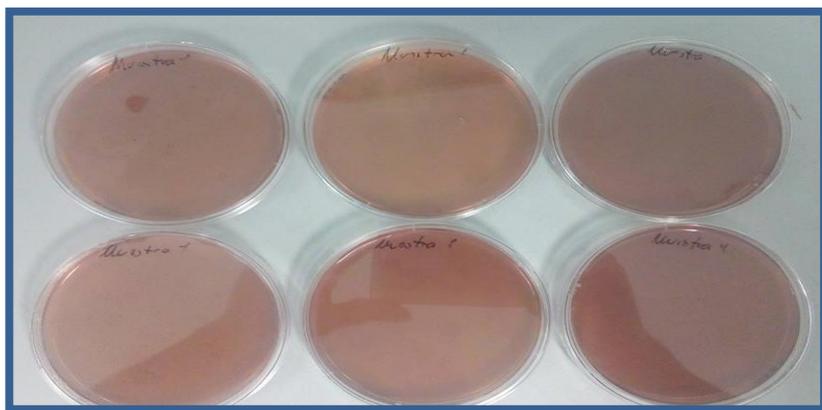


Figura 7. Resultado de prueba de repetibilidad en muestra número 1

Muestra 2

Ensayo de repetibilidad de *Coliformes totales* en muestra que presenta; 10 ml de la matriz de leche pasteurizada, 1 ml del analito de interés en concentración conocida y 90 ml de la solución diluyente (agua peptonada). Se calcularon las unidades formadoras de colonias en cada repetición y obtuvieron los siguientes resultados, (tabla No 9).

Tabla 9. Resultados de recuento en placa para *Coliformes totales* de la muestra numero 2 ensayo de repetibilidad

Repetición	Placa 1	Placa 2	Promedio	Cuenta	Resultado
1	152	160	156	1600	16×10^{-2} UFC/mL
2	78	152	115	1200	12×10^{-2} UFC/mL
3	109	158	134	1300	13×10^{-2} UFC/mL
4	161	164	163	1600	16×10^{-2} UFC/mL
5	155	157	156	1600	16×10^{-2} UFC/mL
6	142	153	148	1500	15×10^{-2} UFC/mL
7	155	156	156	1600	16×10^{-2} UFC/mL
8	168	156	162	1600	16×10^{-2} UFC/mL
9	142	171	157	1600	16×10^{-2} UFC/mL

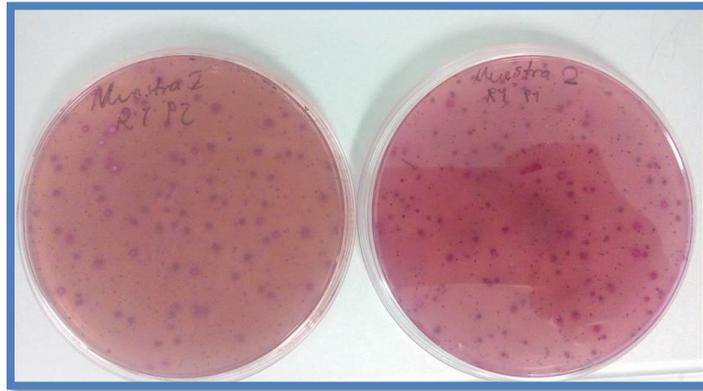
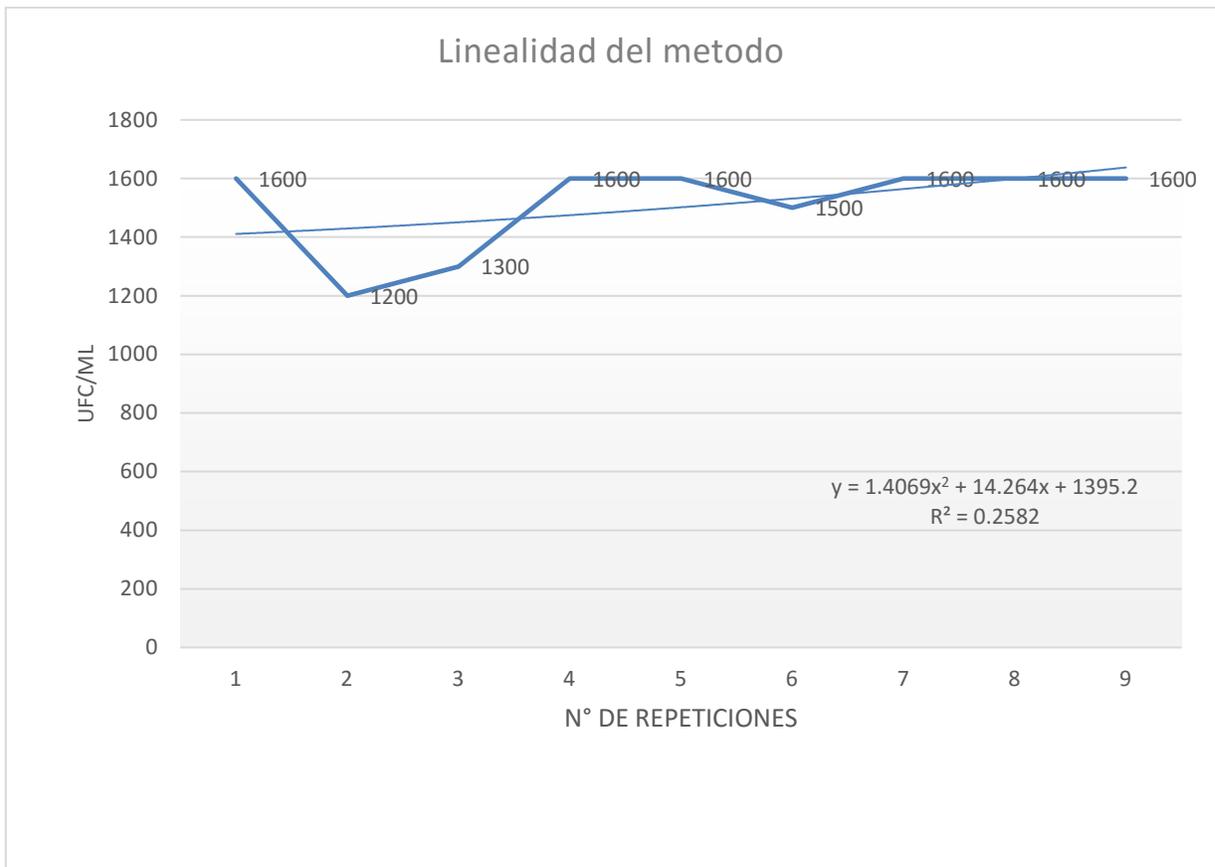


Figura 8. Resultados de prueba de repetibilidad de *Coliformes totales* en muestra numero 2

La dispersión de un conjunto de observaciones se refiere a la veracidad que muestran estas. Una medida de dispersión conlleva información respecto a la cantidad total de variabilidad presente en el conjunto de datos. Si todos los valores son iguales, no hay dispersión, pero si no todas son iguales, entonces existe dispersión en los datos. La desviación estándar o dispersión de las cuentas obtenidas de la tabla anterior es de 144.87 y el promedio de las cuentas fue de 1500 UFC/mL. Por lo cual los límites son: (límite inferior: 1355.13 y límite superior: 1644.87).

Según los datos presentes en la tabla No 9, se presente una dispersión, aunque es de pequeña magnitud, ya que los resultados que arrojan las repeticiones realizadas se encuentran dentro de un rango similar que oscila entre 1200 y 1600 UFC/ ml de Coliformes totales en placas de agar rojo violeta bilis, incubadas a 35°C durante 24 ± 2 h, por lo cual no se hizo necesario transformar dichos resultados a unidades logarítmicas, ya que las cantidades obtenidas se encuentran a una distancia menos de la desviación estándar, lo que deja ver la homogeneidad de los datos obtenidos, entre repeticiones de una misma prueba (figura No 8).



**Figura 9. Gráfica de dispersión Resultado de prueba de repetibilidad
Recuento en placa de *Coliformes Totales* en muestra de leche**

Por otro parte, se realizó un análisis de varianza, desviación estándar y coeficiente de variación para este ensayo, y se obtuvieron los resultados en unidades logarítmicas, presentados en la tabla No 10.

Tabla 10. Análisis de varianzas, desviación estándar y coeficiente de variación prueba repetibilidad recuento en placa de *C. Totales* en leche (muestra 2)

Repetición	Placa 1	Placa 2	Promedio	Cuenta UFC/mL	Log	X	Varianza	Desviación Estándar	Coeficiente de variación %
1	152	160	156	1600	3.20411998	3.17710397	0.00199537	0.04466958	1.40598406
2	78	152	115	1200	3.07918125				
3	109	158	134	1300	3.11394335				
4	161	164	163	1600	3.20411998				
5	155	157	156	1600	3.20411998				
6	142	153	148	1500	3.17609126				
7	155	156	156	1600	3.20411998				
8	168	156	162	1600	3.20411998				
9	142	171	157	1600	3.20411998				

El coeficiente de variación, muestra el grado de concordancia de los datos presentados para la prueba de repetibilidad realizada a la técnica de recuento en placa para *Coliformes Totales* en muestra de leche. Dicho coeficiente de variación (1.46 %) muestra que hay un alto grado de concordancia entre los resultados obtenidos en las nueve repeticiones, ya que se presenta un porcentaje inferior al 20%, demostrando así la varianza relativa presentada en las mediciones.

Muestra 3

Para determinar el intervalo de confianza para la evaluación de la confirmación, fue necesario considerar el análisis de una muestra sin matriz; es decir solo con el diluyente (agua peptonada) y agar (agar rojo violeta bilis lactosa) inoculado con la cepa de control positivo, y manejada en las mismas condiciones que las muestras ensayo.

Ensayo de repetibilidad de *Coliformes Totales* en muestra que presenta; el analito de interés en concentración conocida y la solución diluyente. Se calcularon las unidades formadoras de colonias en cada repetición y se obtuvieron los siguientes resultados (tabla No 11).

Tabla 11. Resultado de recuentos obtenidos para siembra en placa de *Coliformes totales* en solución diluyente (muestra 3)

Repetición	Placa 1	Placa 2	Promedio	Cuenta	Resultado
1	157	154	156	1600	16×10^{-2} UFC/mL
2	189	158	174	1700	17×10^{-2} UFC/mL
3	134	186	160	1600	16×10^{-2} UFC/mL
4	89	155	122	1200	12×10^{-2} UFC/mL
5	159	153	156	1600	16×10^{-2} UFC/mL
6	150	154	152	1500	15×10^{-2} UFC/mL
7	165	151	158	1600	16×10^{-2} UFC/mL
8	152	123	138	1400	14×10^{-2} UFC/mL
9	156	160	158	1600	16×10^{-2} UFC/mL

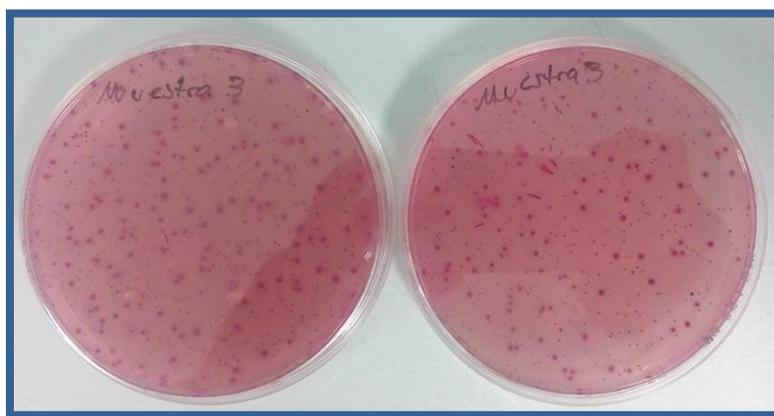


Figura 10. *Coliformes totales* en solución de agua peptonada inoculada, muestra numero 3

La magnitud de la dispersión o desviación estándar de las cuentas obtenidas de la tabla anterior es de 141.42 y el promedio de las cuentas fue de 1500 UFC/ml. Por lo cual los límites son: (límite inferior: 1358.58 y límite superior: 1641.42).

Según los datos presentes en la tabla No 11, se presente una dispersión, aunque es de pequeña magnitud, ya que los resultados que arrojan las repeticiones realizadas se encuentran dentro de un rango similar que oscila entre 1200 y 1700 UFC/ ml de Coliformes totales en placas de agar rojo violeta bilis, incubadas a 35°C durante 24 ± 2 h, por lo cual no se hizo necesario transformar dichos resultados a unidades logarítmicas, ya que las cantidades obtenidas se encuentran a una distancia menos de la desviación estándar, lo que deja ver la homogeneidad de los datos obtenidos, entre repeticiones de una misma prueba (figura n°9).

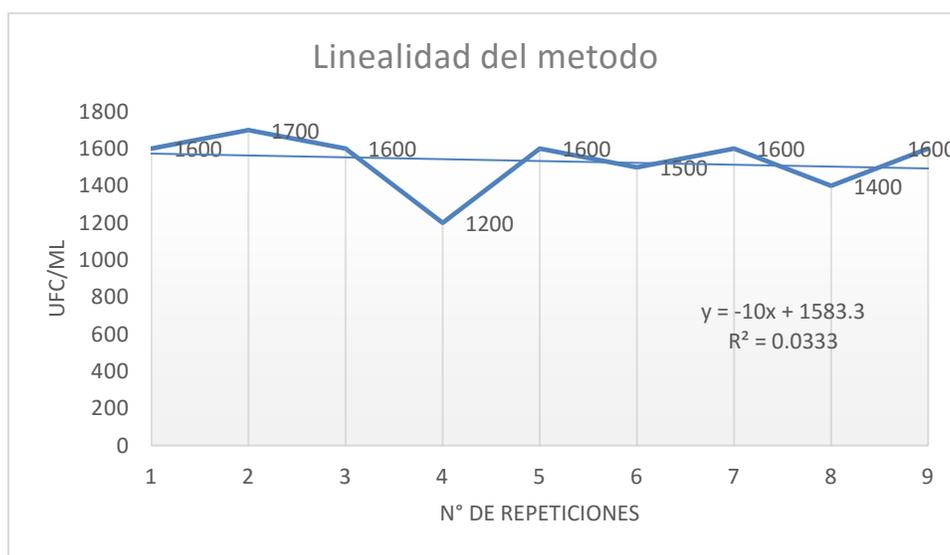


Figura 11. Grafica de dispersión Resultado de prueba de repetibilidad Recuento en placa de *Coliformes Totales* en solución diluyente

Por otro lado, se realizó un análisis de varianza, desviación estándar y coeficiente de variación para esta muestra, y se obtuvieron los resultados en unidades logarítmicas, presentados en la tabla No 12.

Tabla 12. Análisis de varianzas, desviación estándar y coeficiente de variación prueba repetibilidad recuento en placa de *C. Totales* de solución diluyente (muestra 3)

Repetición	Placa 1	Placa 2	Promedio	Cuenta	Log	X	Varianza	Desviación Estándar	Coeficiente de variación
1	157	154	156	1600	3.20411998	3.18360549	0.00185155	0.04302967	1.35160193
2	189	158	174	1700	3.23044892				
3	134	186	160	1600	3.20411998				
4	89	155	122	1200	3.07918125				
5	159	153	156	1600	3.20411998				
6	150	154	152	1500	3.17609126				
7	165	151	158	1600	3.20411998				
8	152	123	138	1400	3.14612804				
9	156	160	158	1600	3.20411998				

El coeficiente de variación, muestra el grado de concordancia de los datos presentados para la prueba de repetibilidad realizada a la técnica de recuento en placa para Coliformes totales en diluyente de agua peptonada, inoculado con la cepa de control. Dicho coeficiente de variación (1.46 %) muestra que hay un alto grado de concordancia entre los resultados obtenidos en las nueve repeticiones, ya que se presenta un porcentaje inferior al 20%, demostrando así la varianza relativa presentada en las mediciones.

Muestra 4

Para determinar el intervalo de confianza para la evaluación de la confirmación, se prepararon cajas control con el diluyente (agua peptonada) y agar (agar rojo violeta bilis lactosa) y fue manejada en las mismas condiciones que las muestras ensayo. Esto para verificar la esterilidad.

Esta muestra se encuentra solo con 90 mL de agua peptonada, debido a que se utilizara como el blanco del análisis. Luego de realizar las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), se tomó 1mL de cada dilución y se llevó a cajas petri estériles, realizando este procedimiento por duplicado en 2 repeticiones.

Tabla 13. Resultados obtenidos en muestra número 4 de verificación de la esterilidad

Repetición	Placa 1	Placa 2	Promedio	Cuenta	Resultado
1	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
2	0	0	0	0	< 10 UFC/ml

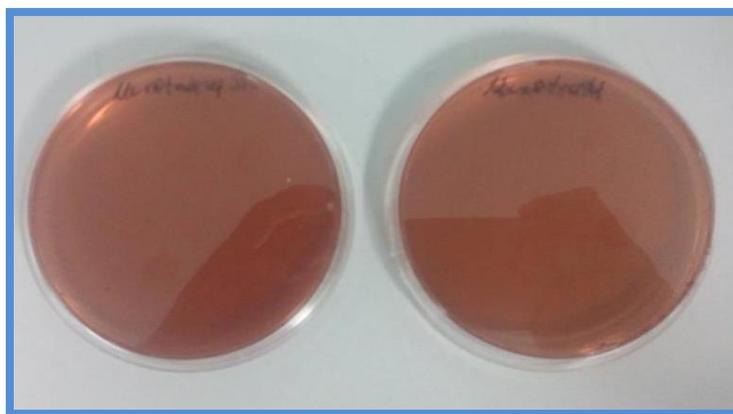


Figura 12. Resultados de recuento en placa de *Coliformes* totales para muestra de agua peptonada

Al realizar el análisis de *Coliformes* totales en la muestra diluyente de agua peptonada, se encontró la ausencia de este microorganismo para las pruebas de evaluación de los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad. Se presentaron datos homogéneos para las pruebas realizadas y la evaluación de los parámetros establecidos en la que la constante como era de esperarse fue 0 UFC en la muestra del diluyente de agua peptonada y un resultado de <10 UFC/ml de *Coliformes* totales en placas de agar rojo violeta bilis, incubadas a 35°C durante 24 ± 2 h. (tabla No 13).

4.10.1.2 Reproducibilidad:

Muestra 5

Ensayo de reproducibilidad de Coliformes totales en muestra que presenta; 10mL del alimento (leche) con 90 mL de agua peptonada, sin el analito de interés. Luego de realizar las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), se tomó 1mL de cada dilución y se llevó a cajas petri estériles, realizando este procedimiento por duplicado en 9 repeticiones. Se calcularon las unidades formadoras de colonias en cada repetición y se obtuvieron los siguientes resultados a las diferentes horas analizadas (tabla No 14).

Tabla 14. Resultados de recuento en placa de *Coliformes totales* en muestra de leche pasteurizada evaluada en diferentes horas (ensayo de reproducibilidad 1) muestra numero 5

Repetición	Placa 1	Placa 2	Promedio	Cuenta	Resultado
Repetición 1 9:00 a.m.	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
Repetición 1 9:00 a.m.	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
Repetición 1 9:00 a.m.	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
Repetición 2 1:00 p.m.	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
Repetición 2 1:00 a.m.	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
Repetición 2 1:00 a.m.	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
Repetición 3 5:00 p.m.	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
Repetición 3 5:00 p.m.	0	0	0	0	< 10 UFC/ml
Repetición 3 5:00 p.m.	0	0	0	0	< 10 UFC/ml

En este ensayo tampoco se encontró crecimiento de *Coliformes totales*, lo cual confirma lo que se esperaba para la muestra de leche pasteurizada, pues, como se mencionó anteriormente, este microorganismo no debe encontrarse en este alimento, ya que la presencia de este grupo de microorganismos indica puntos críticos de contaminación que pueden ir desde materias primas que fueron utilizadas, errores de manipulación durante el proceso de producción, hasta errores en el proceso de pasteurización. Por lo general los *Coliformes* se presentan en productos crudos, a los cuales no se les realiza ningún tipo de proceso de cocción.

Se presentaron datos homogéneos para las pruebas realizadas a diferentes tiempos, en los que la constante fue la obtención en cada repetición de 0 UFC en la muestra y un resultado de <10 UFC/ml de *Coliformes totales* en placas de agar rojo violeta bilis, incubadas a 35°C durante 24 ± 2 h. (tabla No 14).

Muestra 6

Ensayo de reproducibilidad de *Coliformes totales* en muestra que presenta; el analito de interés en concentración conocida, matriz de leche pasteurizada y solución diluyente. Se calcularon las unidades formadoras de colonias en cada repetición y se obtuvieron los siguientes recuentos a las diferentes horas analizadas (tabla No.15).

Tabla 15. Resultados recuentos en placa de *Coliformes totales* en muestra de leche en diferentes horas (ensayo reproducibilidad 2) muestra No. 6

Repetición	Placa 1	Placa 2	Promedio	Cuenta	Resultado
Repetición 1 9:00 a.m.	132	107	120	1200	12×10^{-2} UFC/ml
Repetición 1 9:00 a.m.	152	116	134	1300	13×10^{-2} UFC/ml
Repetición 1 9:00 a.m.	138	117	128	1300	13×10^{-2} UFC/ml
Repetición 2 1:00 p.m.	132	147	140	1400	14×10^{-2} UFC/ml
Repetición 2 1:00 a.m.	125	117	121	1200	12×10^{-2} UFC/ml
Repetición 2 1:00 a.m.	131	138	135	1400	14×10^{-2} UFC/ml
Repetición 3 5:00 p.m.	52	121	87	900	9×10^{-2} UFC/ml
Repetición 3 5:00 p.m.	34	74	54	500	5×10^{-2} UFC/ml
Repetición 3 5:00 p.m.	71	140	106	1100	11×10^{-2} UFC/ml

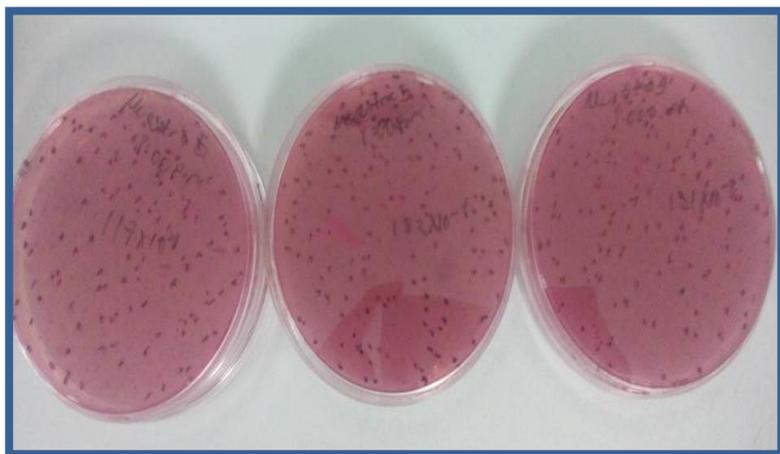


Figura 12. Resultados de recuento en placa de *Coliformes totales* en prueba de reproducibilidad (repetición 1, 1:00 p.m p.m.).

Según los valores presentados en la tabla No. 15, se presenta una dispersión en los datos, aunque es de pequeña magnitud, ya que los resultados los resultados que arrojaron las repeticiones realizadas a las diferentes horas se encuentran dentro de un rango similar que oscila entre las 1200 y 1400 UFC/ml de *Coliformes totales* en placas de agar rojo violeta bilis, incubadas a 35°C durante 24 ± 2 h, lo que permite ver la homogeneidad de los datos obtenidos. (figura No.13).

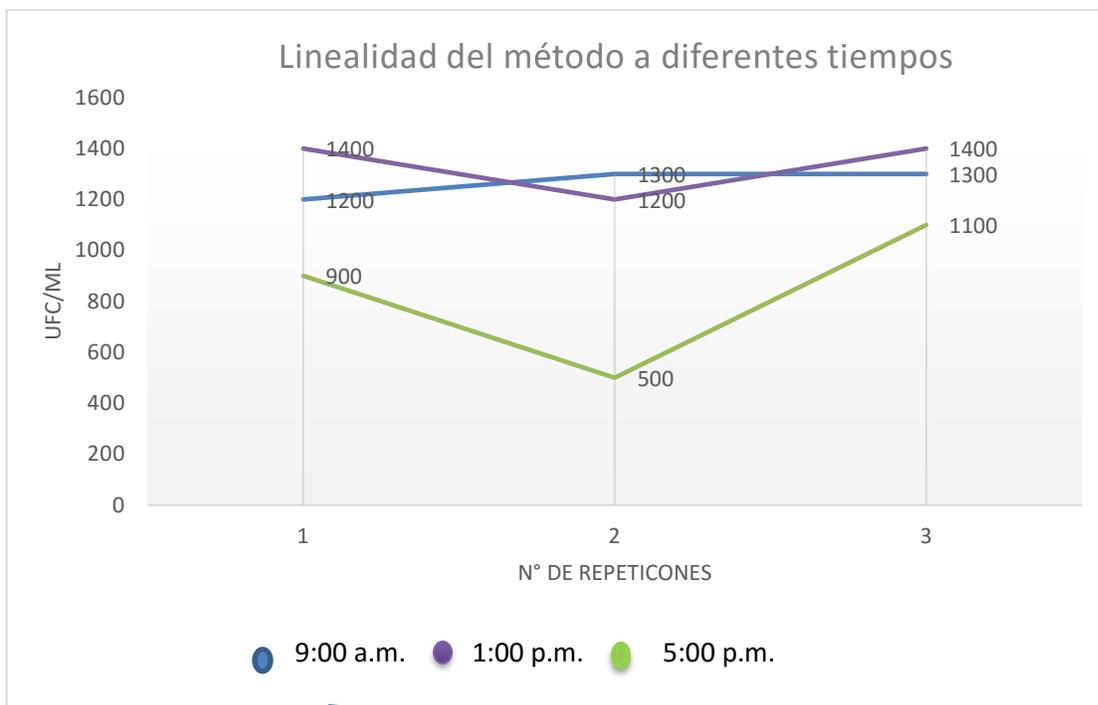


Figura 13. Gráfica de dispersión prueba de reproducibilidad de *Coliformes totales* a las diferentes horas analizadas, muestra numero 6

Igualmente, se realizó un análisis de varianza, desviación estándar y coeficiente de variación para este ensayo, en donde se obtuvieron los resultados a las diferentes horas analizadas presentadas en la tabla No 16.

Tabla 16. Análisis de varianzas, desviación estándar y coeficiente de variación de la prueba de reproducibilidad para recuento en placa de *C. Totales* en leche a diferentes horas (ensayo de reproducibilidad 2) muestra No. 6.

Repetición	Promedio	Cuenta	Log	X	Varianza	Desviación Estándar	Coefficiente de variación
Repetición 1 9:00 am.	120	1200	3.07918125	3.102355984	0.000268534	0.016387014	0.528211918
Repetición 1 9:00 am.	134	1300	3.11394335				
Repetición 1 9:00 am.	128	1300	3.11394335				
Repetición 2 1:00 p.m.	140	1400	3.14612804	3.123812439	0.000995972	0.031559019	1.01027254
Repetición 2 1:00 p.m.	121	1200	3.07918125				
Repetición 2 1:00 p.m.	135	1400	3.14612804				
Repetición 3 1:00 p.m.	87	900	2.95424251	2.8982017333	0.0211125	0.14530141	5.013502276
Repetición 3 1:00 p.m.	54	500	2.69897				
Repetición 3 1:00 p.m.	106	1100	3.04139269				

El coeficiente de variación, muestra el grado de concordancia de los datos presentados para la prueba de reproducibilidad a diferentes horas realizada a la técnica de recuento en placa de *Coliformes totales* en muestras de leche (Tabla No 16). Se obtuvieron coeficientes de variación de 0.53 % a la primera hora analizada (9:00 a.m.), 1.01 % a la segunda hora analizada (1:00 p.m) y (5.01%)a la tercera hora analizada (5:00 p.m.). Estos coeficientes de variación demuestran que hay un alto grado de concordancia entre los resultados obtenidos en las diferentes horas analizadas, ya que presentan un porcentaje inferior al 20%.

4.10.1.3 Porcentaje de recuperación (PR)

Con los datos obtenidos en repetibilidad en las muestras fortificadas, se calculó la cantidad de UFC, en cada repetición y se calculó el logaritmo de cada cuenta, se calculó el promedio de los logaritmos, así como también el logaritmo del inoculo de la cepa de referencia utilizado, el cual fue (log 3.20), para obtener el porcentaje de recuperación de cada muestra inoculada.

$$\% \text{ recuperación} = \frac{\text{Media de la cuenta de logaritmo de las cuentas} \times 100}{\text{Logaritmo de las UFC inoculadas}}$$

- Muestra 2 / *Porcentaje de recuperación* =99.37%
- Muestra 3/ *Porcentaje de recuperación* =99.46%
- Muestra 6 (Repetición 1) / *Porcentaje de recuperación* =96.87%
- Muestra 6 (Repetición 2) / *Porcentaje de recuperación* =97.5%
- Muestra 6 (Repetición 3) / *Porcentaje de recuperación* =90.31%

4.10.1.4 Sesgo

A partir de los cálculos de recuperación; se calculó la diferencia de la media de los logaritmos de las cuentas menos el logaritmo del inoculo utilizado. Posteriormente se obtuvo el sesgo o error en las muestras inoculadas:

- Muestra 2/ *Sesgo* = (0.023)
- Muestra 3/ *Sesgo* = (0.017)
- Muestra 6 (Repetición 1) / *Sesgo* = (0.098)
- Muestra 6 (Repetición 2) / *Sesgo* = (0.077)
- Muestra 6 (Repetición 3) / *Sesgo* = (0.302)

En la práctica el sesgo es la diferencia del resultado recuperado con respecto al resultado esperado. Si la diferencia que hay entre el resultado promedio de la medida de una referencia y el valor asignado como referencia del mismo es menor o igual que la explicación que puede dar la precisión, se establece que no existe un error sistemático significativo. Por lo tanto, no

hay sesgo. Los resultados obtenidos en las muestras indican que no hubo un error sistemático significativo con respecto al valor obtenido en función del valor esperado.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El Laboratorio Higienic sanitary cumple los requisitos de la Norma ISO/IEC 17025:2005 en el apartado de competencia técnica, para laboratorio de ensayo.
- La metodología de la norma CCAYAC-P-062-1 permitió evaluar la repetibilidad y reproducibilidad en la confirmación del método de bacterias *Coliformes totales* en placa en muestras de leche, la cual arrojó coeficientes de variación con altos índices de precisión para los diferentes ensayos realizados; lo que significa que entre ensayos existe una variación menor al 20%.
- Así mismo dicha metodología ayudó a establecer los lineamientos y criterios para realizar una evaluación del desempeño de los métodos de prueba desarrollados en el laboratorio.
- Los resultados del coeficiente de variación (CV%) en la repetibilidad del método para los diferentes niveles de concentración de las muestras, se encuentra dentro del criterio de aceptación, por lo que el método cumple con el parámetro de repetibilidad de la precisión de acuerdo al método validado.
- Para la reproducibilidad del método microbiológico no se observan cambios significativos en la variabilidad, manteniéndose dentro del criterio de aceptación. El método se encuentra conforme al criterio de variación en los diferentes de concentración de las muestras con o sin la matriz de trabajo, por lo que se considera que cumple con la reproducibilidad de la precisión del método.
- De acuerdo con los resultados obtenidos durante todo el proceso de confirmación, se concluye que el método de recuento en placa para el análisis de *Coliformes totales*, posee precisión y exactitud, por lo tanto, se confirma que el método ha sido establecido de acuerdo al método validado.
- La demostración de los parámetros de calidad de los medios de cultivo, tales como esterilidad, selectividad y pH arrojó altos grados de confiabilidad para el estudio realizado.

- Se realizaron las verificaciones técnicas respectivas para cada uno de los equipos involucrados en los ensayos, mediante la recolección de los certificados de calibración, verificación y mantenimiento.
- El análisis de diversos factores que influyen en las técnicas como medios de cultivo, equipos, ambientes, entre otros dieron confiabilidad a la conformación realizada.

5.2 Recomendaciones

- Realizar pruebas interlaboratorios nacionales para dar mayor confiabilidad a los resultados obtenidos en el laboratorio.
- Realizar otro tipo de pruebas que permitan evaluar límites de detección, incertidumbre y otros parámetros que permitan generar mayor confiabilidad de las técnicas utilizadas en el laboratorio y por ende contribuyan en el proceso de acreditación del laboratorio de calidad.
- Tomar en cuenta que al realizar las diluciones de las concentraciones del inóculo de microorganismo, se debe utilizar material debidamente esterilizado, además se debe asegurar la distribución homogénea de cada una de las diluciones, así como de la cepa y de la muestra, para la obtención de resultados satisfactorios.
- Que el número de repeticiones para determinar precisión sea de al menos 9, por duplicado, para obtener gráficas representativas del comportamiento de los datos obtenidos.

6. REFERENCIAS

- Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.*
- Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, *Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigeradores, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.*
- NOM-109-SSA1-1994 *Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.*
- NOM-110-SSA1-1994 *Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.*
- Norma CCAYAC-P-062-2012. *Guía para la evaluación de desempeño de métodos de prueba microbiológicos para el análisis de alimentos*
- Norma CCAYAC-CR-01-2016. *Criterios para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos por la técnica del número más probable.*
- Manual de prácticas de laboratorio de microbiología I y II: Diversidad y estructura de los microorganismos 2009. Universidad Autónoma de Guerrero.
- Gomez, M. Vásquez, M. Peña, P. 1999. Determinación y diferenciación de *Escherichia coli* y Coliformes totales usando un mismo sustrato cromogénico. Laboratorio central. Aquagest Galicia España.
- Soler, L. (2006). Validación secundaria del método de número más probable y recuento en placa profunda para Coliformes totales y fecales en muestras de alimentos basada en la norma ISO NTC 17025. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.

Anexos:

Anexo 1. Cronograma de actividades

• No.	Actividad	Específico	P/R	SEMANAS																
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
1	Evaluación	Evaluación del cumplimiento de la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006.	P	■	■	■														
			R																	
2	Elaboración de protocolo	Protocolo para la evaluación de desempeño del método.	P	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
			R																	
3	Selección de las matrices.	Selección de las muestras con base en criterios definidos del plan confirmación.	P			■	■	■												
			R																	
4	Preparación del inoculo.	Realizar los cálculos para la preparación del inoculo.	P						■	■	■	■	■	■	■					
			R																	
5	Preparación de las muestras	Fortificación de las muestras.	P														■	■		
			R																	
6	Ejecución del protocolo.	Analizar la muestra según el método de NMP.-	P						■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
			R																	
7	Cálculos	Reproducibilidad y repetibilidad.	P															■	■	
			R																	
8	Calculo de la incertidumbre	Se mencionan fuentes de incertidumbre.	P															■	■	
			R																	
9	Elaboración del informe	Elaborar informe de resultados.	P															■	■	■
			R																	

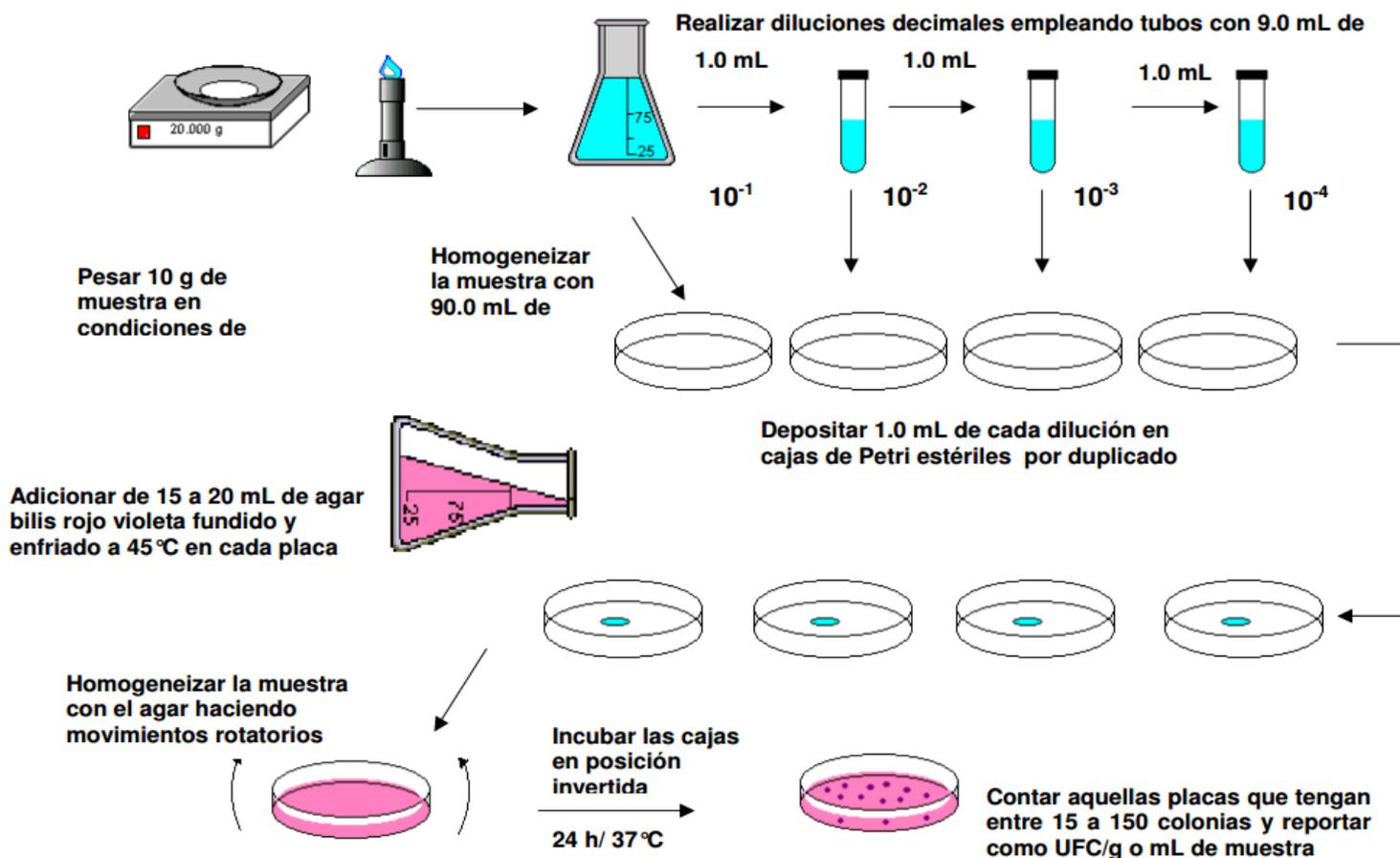
Anexo 2. Formato de elaboración de protocolo

Estructura para el protocolo para la evaluación del desempeño de análisis microbiológicos

Título	Protocolo para la evaluación del desempeño del método: nombre y clave del método que se pretende evaluar.
1. Objetivo	Considerar los parámetros de desempeño a evaluar y el analito a determinar.
2. Campo de aplicación	Indicar el tipo de producto (S) para los cuales aplica la validación.
3. Método de ensayo	Elaborar un diagrama de flujo del método en cuestión.
4. Equipo	Mencionar el equipo a utilizar y las condiciones que requiere (verificación y/o calibración, si aplica).
5. Materiales	Indicar los materiales a utilizar.
6. Reactivos y medios de cultivo	a) Indicar el nombre de los reactivos a utilizar y su grado. b) Indicar los medios de cultivo a utilizar. c) Indicarlas cepas que se usaran y la forma de preparar los inóculos.
7. Muestras	Indicar las características, forma de almacenamiento y cantidades de muestra estimadas para llevar a cabo la validación. Detallar la preparación de los blancos de muestra o muestras adicionadas.
8. Desarrollo experimental	Detallar las instrucciones para cada uno de los parámetros de desempeño a ensayar.
9. Resultados	Formato para el registro de resultados.
10. Análisis estadístico	Establecer para cada parámetro de desempeño la herramienta estadística a utilizar para su evaluación.
11. Criterios de aceptación	Establecer los criterios de aceptación que deben cumplirse con su respectiva referencia bibliográfica.

Anexo 3. Metodología para determinación de Coliformes totales por cuenta en placa

DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES POR CUENTA EN PLACA



Versión para Administrador de Manuales y Documentos (AMyD) de la Facultad de Química, UNAM

4