

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

Verificación de método analítico para la cuantificación de microorganismos en placas con
medio deshidratado

Código de Proyecto Integrador

INGE - 2845

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Ingeniera en Alimentos

Presentado por:

Dayse Viviana Velez Caiche

Guayaquil - Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

A mis padres, Carmen y Byron, por su apoyo incondicional a perseguir mis sueños.

A todas las personas, que de una u otra manera, contribuyeron en cada paso a largo de mi trayectoria profesional.

A mí, por la constancia, esfuerzo y dedicación que permitieron transformar los desafíos en oportunidades de aprendizaje.

¡El amor inquebrantable hace posible hasta lo imposible!

Dayse Velez Caiche

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a Dios,
por darme la fortaleza, sabiduría y
perseverancia para cumplir mis metas.
Especialmente a mis padres, por su
infinito amor y brindarme una educación
de calidad. Creer y confiar en mí fue el
motor necesario para perseguir mis
sueños muy lejos de casa.

Asimismo, agradezco a mis amigos y
maestros, quienes formaron parte de mi
etapa universitaria y me permitieron vivir
una de las mejores experiencias de mi
vida.

Por último, manifiesto mi gratitud a la
empresa, a sus instalaciones y a las
personas que contribuyeron
significativamente en el desarrollo de este
proyecto.

Dayse Velez Caiche

Declaración Expresa

Yo Dayse Viviana Velez Caiche acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al autor que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 26 de mayo del 2025.


Dayse Viviana
Velez Caiche

Evaluadores

MSc. Andrea Desire Ortega

Suasnavas

Profesor de Materia

MSc. Verónica Rafaela Guadalupe

Moyano

Tutor de proyecto

Resumen

Los métodos tradicionales para cuantificar microorganismos suelen requerir mucho tiempo, provocando que un laboratorio que brinda el servicio de análisis en alimentos tenga retrasos en la entrega de resultados. Este trabajo tiene como objetivo evaluar un protocolo de verificación de un método rápido para cuantificar *Staphylococcus aureus* en placas deshidratadas siguiendo la norma ISO 16140-3:2021. Se establecen dos etapas: verificación de implementación y verificación de artículos. La primera consiste en calcular la desviación estándar de reproducibilidad (S_{IR}) al contaminar doce muestras de jamón y compararla con los datos proporcionados en el estudio de validación del método (S_R). La segunda etapa, se da al contaminar seis alimentos de diferentes categorías, proceso en el que se determina el sesgo estimado (eBias) que permite evaluar el desempeño del método. Se obtuvo un S_{RI} de 0.042, mientras que el $SR \times 2$ es 0.044. Para la verificación de los seis alimentos, el eBias fue de 0.26, 0.41, 0.6, 0.08, 0.26, 0.08, respectivamente, los cuales son menores a 0.5 Log_{10} ; por tanto se puede determinar que los resultados de ambas etapas cumplen con los criterios especificados por la norma, concluyendo que se ha implementado eficazmente el método rápido y se puede ejecutar en cualquier alimento.

Palabras Clave: Verificación, inóculo, *Staphylococcus aureus*, método rápido, categoría de alimentos.

Abstract

Traditional methods for quantifying microorganisms are often time-consuming, causing delays in delivering results to laboratories providing food analysis services. This study aims to evaluate a verification protocol for a rapid method for quantifying Staphylococcus aureus in dehydrated plates following the ISO 16140-3:2021 standard. Two stages are established: implementation verification and article verification. The first consists of calculating the reproducibility standard deviation (SIR) by contaminating twelve ham samples and comparing it with the data provided in the method validation study (SR). The second stage occurs when six foods from different categories are contaminated, a process in which the estimated bias (eBias) is determined, allowing the method's performance to be evaluated. An SRI of 0.042 was obtained, while the $SR \times 2$ is 0.044. For the verification of the six foods, the eBias values were 0.26, 0.41, 0.6, 0.08, 0.26, and 0.08, respectively, which are less than 0.5 Log10; therefore, it can be determined that the results of both stages meet the criteria specified by the standard, concluding that the rapid method has been effectively implemented and can be performed on any food.

Keywords: *Verification, inoculum, Staphylococcus aureus, rapid method, food category.*

Índice general

Resumen.....	I
Abstract	II
Índice general.....	III
Abreviaturas.....	VI
Simbología	VII
Índice de figuras.....	VIII
Índice de tablas	VIII
Capítulo 1.....	1
1. Introducción	2
1.2 Descripción del Problema.....	3
1.3 Justificación del Problema.....	4
1.4 Objetivos.....	5
1.4.1 Objetivo general	5
1.4.2 Objetivos específicos	5
1.5 Marco teórico.....	6
1.5.1 Inocuidad alimentaria.....	6
1.5.2 Control microbiológico en la industria alimentaria	7
1.5.2.1 Staphylococcus aureus.....	8
1.5.3 Método de recuento microbiológico	8
1.5.4 Normas ISO.....	9

1.5.5 Validación de métodos.....	9
1.5.6 Verificación de métodos	10
1.5.7 Verificación en artículos alimentarios	10
1.5.8 Reproducibilidad y repetibilidad de métodos microbiológicos.	10
Capítulo 2.....	12
2. Metodología	13
2. 1 Etapa 1: Verificación de la implementación	13
2. 1.1 Selección de matriz alimentaria	13
2.1.2 Preparación de cepa.....	14
2.1.3 Preparación del inóculo.....	14
2.1.4 Verificación de carga natural de la muestra.....	15
2.1.5 Contaminación de muestra.....	16
2.1.6 Recuento de colonias.....	16
2.1.7 Evaluación de resultados.....	17
2.1.8 Límite de aceptación	17
2. 2 Etapa 2:Verificación de artículos (alimentos)	17
2.2.1 Selección de matrices alimentarias	18
2.2.2 Preparación de inóculo y contaminación de muestra.....	19
2.2.3 Recuento.....	21
2.2.4 Evaluación de resultados.....	21
Capítulo 3.....	22

3. Resultados y análisis	23
3.1 Etapa 1: Verificación de implementación	23
3.1.1 Controles	23
3.1.2 Resultados del ensayo de verificación	25
3.2 Etapa 2: Verificación de artículos (alimentos)	30
3.2.1 Controles	30
3.2.1 Resultados del ensayo de verificación de artículos.....	31
Capítulo 4.....	36
4. Conclusiones y recomendaciones	37
4.1 Conclusiones.....	37
4.2 Recomendaciones	38
Referencias.....	39
Apéndice A. Materiales, equipos y condiciones ambientales.....	45
Apéndice B. Cálculos de inoculación	48
Apéndice C. Tabulación de datos primarios	51

Abreviaturas

AOAC	Association of Official Analytical Collaboration
BAM	Bacteriological Analytical Manual
BPBW	Butterfield's phosphate - buffered dilution water
CEN	Comité Europeo de Normalización
eBias	Sesgo estimado
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
ISO	Organización Internacional de Normalización
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
PCA	Plate Count Agar
S _{IR}	Desviación estándar de reproducibilidad del método verificado
S _R	Desviación estándar del estudio de validación
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

Simbología

g	Gramos
mL	Mililitros
μL	Microlitros
pH	Potencial de Hidrógeno

Índice de figuras

Figura 1 <i>Gráfica Analista A y Analista B vs la carga control del inóculo</i>	27
--	----

Figura 2 <i>Resultado de eBias vs la carga teórica del inóculo</i>	34
---	----

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Alimentos utilizados en la verificación de artículo</i>	19
---	----

Tabla 2 <i>Niveles de inoculación en las muestras</i>	20
--	----

Tabla 3 <i>Recuento estimado por gramo de alimento</i>	20
---	----

Tabla 4 <i>Carga microbiana natural de las muestras de jamón</i>	24
---	----

Tabla 5 <i>Control de carga inóculo y control de esterilidad del diluyente</i>	25
---	----

Tabla 6 <i>Resultados de carga de las muestras de jamón contaminadas expresados en 10^1</i>	26
--	----

Tabla 7 <i>Desviación estándar (S_{RI}) del ensayo realizado en el laboratorio</i>	28
--	----

Tabla 8 <i>Datos obtenidos en el estudio de validación</i>	29
---	----

Tabla 9 <i>Carga microbiana de las muestras control</i>	31
--	----

Tabla 10 <i>Control de carga microbiana del diluyente</i>	31
--	----

Tabla 11 <i>Resultados obtenidos del ensayo en las seis categorías propuestas</i>	32
--	----

Tabla 12 <i>Equipos utilizados en el ensayo</i>	46
--	----

Tabla 13 <i>Materiales utilizados en el ensayo</i>	46
---	----

Tabla 14 <i>Condiciones de laboratorio al realizar el ensayo</i>	47
---	----

Tabla 15 <i>Datos primarios obtenidos al evaluar la carga natural de las muestras de jamón</i>	52
---	----

Tabla 16 <i>Datos primarios obtenidos por el analista A de las muestras de jamón inoculada</i>	53
---	----

Tabla 17 <i>Datos primarios obtenidos por el analista B de las muestras de jamón inoculada</i>	54
---	----

Tabla 18 <i>Datos primarios de obtenidos al evaluar la carga natural de los diferentes alimentos</i>	55
---	----

Tabla 19 <i>Datos primarios de las muestras inoculadas</i>	56
Tabla 20 <i>Datos primarios del inóculo + diluyente</i>	57

Capítulo 1

1. Introducción

La inocuidad alimentaria se ha convertido en un tema de vital importancia desde inicios del siglo XXI, tanto el ámbito comercial como político han mostrado preocupación por incidentes que se han presentado en el sector alimentario. Se estima que alrededor de 600 millones de personas a nivel mundial se enferman anualmente y 420000 pierden la vida a causa de enfermedades transmitidas por los alimentos (Organización Mundial de la Salud, 2015).

La responsabilidad de la industria alimentaria en primera instancia es corroborar que sus productos son de calidad y cumplen con criterios de inocuidad, priorizando así la salud del consumidor. De este modo, se establece que los análisis microbiológicos en alimentos son de carácter importante. No todos los microorganismos representan un riesgo para la salud humana, por lo que algunos son monitoreados según las normas del Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN), las cuales establecen límites microbiológicos aceptables en los diferentes alimentos. En el caso de los microorganismos patógenos, las pruebas deben demostrar su ausencia y para algunos casos límites permitidos (Quintela et al., 2022).

Por otro lado, el mercado nacional e internacional exige evidencias del cumplimiento de normas, lo que lleva a la industria a contratar servicios externos que permitan validar su proceso, ya que regularmente no cuentan con todos los métodos implementados. Para la industria alimentaria, trabajar con laboratorios acreditados, constituye una garantía en cuanto a resultados confiables.

Los métodos tradicionales para determinaciones microbiológicas constituyen una serie de pasos, los cuales conllevan un mayor tiempo en la obtención de resultados. Para mitigar esto, la microbiología ha tenido que adaptar a cambios en la industria. Los métodos rápidos simplifican ciertos pasos dentro de un análisis microbiológico, como es la preparación de medios de cultivo, lo que reduce el tiempo de respuesta de resultados (Borin

et al., 2021). Estos métodos rápidos son validados por sus fabricantes bajo ciertas condiciones y normas estandarizadas.

Los laboratorios acreditados que brindan el servicio de análisis deben cumplir con requisitos establecidos por la norma ISO 17025 para poder demostrar su competencia y validez técnica. La implementación de un método por primera vez en un laboratorio requiere de una verificación inicial o validación previa según su uso previsto. Los métodos que no requieren cambios en su procedimiento deben pasar por una verificación, la cual parte de un estudio de validación que ha sido aprobado por organizaciones internacionales. Además, se establece que la verificación de un método debe repetirse cuando se actualice la normativa o se realicen cambios significativos en el mismo, como lo es introducir nuevos instrumentos o cambiar de personal técnico (ISO 16140-3, 2021).

1.2 Descripción del Problema

Un laboratorio que ofrece análisis de alimentos a diferentes industrias del país tiene la necesidad de mejorar su competitividad frente a otros laboratorios que presentan servicios similares. Actualmente, existe una alta demanda de ensayos microbiológicos, por lo que la utilización de métodos rápidos, como el uso de placas con medio deshidratado, es una vía más rápida frente a métodos tradicionales.

El laboratorio posee una acreditación internacional, sin embargo, aspira obtener una acreditación nacional para la cuantificación de *Staphylococcus aureus* empleando un método rápido, de tal manera que, esto ayude a fortalecer la confianza de los clientes. Como parte de este proceso, el laboratorio necesita verificar previamente dicho método, demostrando que es apto para su uso previsto frente a una amplia gama de productos. Esta verificación es un requisito importante para sustentar la competencia técnica del laboratorio ante el organismo de acreditación nacional.

No verificar el método rápido para cuantificar *Staphylococcus aureus* influye en no poder incluirlo en el alcance de acreditación, afectando así al laboratorio, limitando su capacidad competitiva y al sector industrial alimentario. Este último busca obtener resultados confiables, rápidos y técnicamente validados para cumplir con los requerimientos tanto nacionales como internacionales y poder comercializar sus productos.

1.3 Justificación del Problema

La industria alimentaria ecuatoriana debe asegurarse de brindar productos de calidad y seguros para el consumo del ser humano, que permitan reducir la aparición de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA). Para verificar que un producto es seguro para el consumo humano, este debe cumplir con la norma que regule el alimento, la cual establece requisitos de análisis, entre los que se encuentran los microbiológicos.

Por ejemplo, Ecuador cuenta con protocolos para el control sanitario de productos de exportación que es regulado por la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) de acuerdo con el Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Se exige un reporte de análisis microbiológico emitido por un laboratorio acreditado que incluya parámetros establecidos por la normativa que regule dicho producto. Estos laboratorios son acreditados bajo la norma ISO 17025 (2017) y se rigen a un sistema de gestión mediante la cual se estandariza sus procesos y se aseguran de no contar con conflictos de interés para el análisis de las muestras.

Los clientes, empresas dedicadas a la producción de alimentos, tienen la necesidad de buscar un laboratorio que les brinde servicios de análisis con resultados confiables, mediante el uso de métodos verificados. La entrega de resultados erróneos puede provocar el rechazo y retorno del producto, afectar la reputación de la empresa, provocar pérdidas económicas, multas, sanciones, suspensiones, entre otras.

Las acreditaciones otorgadas por los organismos de control contribuyen a posicionar la imagen de prestigio de los laboratorios. Por esta razón, se busca cumplir con el requisito de verificar el método rápido. Además, el uso de herramientas que ayuden a obtener resultados mucho más rápidos representa una ventaja traducida en tiempo frente a métodos tradicionales. Por lo tanto, verificar el uso de placas con medio deshidratado, MicroFast®, como método rápido para el cuantificar *Staphylococcus aureus* siguiendo normas es fundamental para mantener la confianza en la calidad de los análisis.

Staphylococcus aureus es un patógeno que produce toxinas que son responsables intoxicaciones alimentaria. Naturalmente las personas pueden ser portadores de este microorganismo y encontrarse en la piel, mucosas y nariz. Cuando las personas con esta condición manipulan los alimentos existe un alto riesgo de transmisión directa y convertirse en un agente patógeno (Pérez-Boto et al., 2023). Debido a esto, existe demanda de análisis para este parámetro por parte de la industria, ya que este microorganismo es un indicador de higiene y seguridad alimentaria.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar un protocolo de verificación de método para la cuantificación de *Staphylococcus aureus* en muestras alimentarias, con la utilización de placas deshidratadas en un laboratorio del cantón Durán.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Verificar la viabilidad del método para determinación de *Staphylococcus aureus*, en una categoría de alimento bajo la normativa 16140-3, para su comparación con el estudio de validación de las placas y la determinación de aceptación del método
2. Verificar la viabilidad del método en artículos (matrices alimentarias) mediante ensayos en seis categorías de alimentos utilizando tres diferentes niveles de

contaminación microbiana para la comparación de resultados y la extensión el alcance del laboratorio a una amplia gama de productos.

3. Determinar si el método rápido para la determinación de *Staphylococcus aureus* puede ser implementado en el laboratorio, mediante el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Inocuidad alimentaria

La inocuidad alimentaria es un tema sustancial para la salud pública a nivel mundial, ya que el consumo de alimentos en mal estado o contaminados provoca millones de enfermedades cada año. Por ello, su objetivo es garantizar que los alimentos consumidos sean seguros y no representen riesgos para la salud, ya sea por la presencia de bacterias, sustancias químicas como pesticidas o metales pesados o elementos físicos tales como: vidrios, metales o plásticos (Singh & Puniya, 2024).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2024), anualmente, millones de personas a nivel mundial se enferman debido al consumo de alimentos contaminados y fallecen por esta causa. Esta realidad impacta con mayor fuerza en los países de ingresos bajos y medianos, donde se estima que se pierden cerca de 110 000 millones de dólares al año en productividad y costos médicos asociados a enfermedades transmitidas por los alimentos.

Los patógenos más comunes involucrados en los brotes de ETA incluyen *Salmonella* spp., Norovirus, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (Gourama, 2020).

Un estudio realizado entre octubre de 2021 y marzo de 2023 en el Departamento de Oncología del Hospital Laquintinie de Douala (Camerún) informó de hallazgos significativos, alrededor de 507 pacientes estudiados, 81 (15,97%) estaban infectados por

Staphylococcus aureus, con una alta prevalencia de resistencia a la meticilina (SARM). El estudio demostró que las tasas de resistencia en pacientes con cáncer eran notablemente superiores a las de los pacientes sin cáncer, destacando así la importancia de la inocuidad alimentaria para los seres humanos (Kengne et al., 2024).

1.5.2 Control microbiológico en la industria alimentaria

En la industria alimentaria, los microorganismos juegan un papel fundamental en la producción, conservación y seguridad de los alimentos. Mientras que los microorganismos beneficiosos facilitan procesos como la fermentación, otros pueden provocar contaminación y enfermedades. Entre los microorganismos más comunes en la industria alimentaria se encuentra la *Listeria monocytogenes* debido a su capacidad para contaminar los productos después del cocinado, por lo tanto, el control microbiológico es esencial para mantener la calidad y seguridad alimentaria (Bodie et al., 2024).

Los métodos predictivos de microbiología están siendo cada vez más incorporados en los protocolos de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) para prever el crecimiento microbiano y evaluar los riesgos, lo cual es fundamental para asegurar la seguridad alimentaria en un mercado que se vuelve más complejo (Taiwo et al., 2024). Asimismo, estas acciones involucran control en el crecimiento microbiano por lo que se deben realizar análisis microbiológicos para confirmar que los métodos incorporados resultan efectivos frente a la presencia de microorganismos que puedan contaminar el producto y llegar al consumidor.

1.5.2.1 Staphylococcus aureus. Es una bacteria patógena transmitida por los alimentos y puede causar intoxicación alimentaria debido a la producción de enterotoxinas (Kim et al., 2021). Posee con morfología de cocos, por lo que cuando se agrupa, a través del microscopio se observan como racimos de uvas. Pertenece al grupo de las Gram positivas, y es una bacteria aerobia facultativa, puesto que puede crecer en presencia o ausencia de oxígeno. Es capaz de crecer en concentraciones de hasta 10% de sal, por lo que se denomina halotolerante y de esta manera puede sobrevivir en diferentes alimentos. Las pruebas de identificación para esta bacteria es catalasa y coagulasa positiva (Bennett et al., 2023).

Esta bacteria se encuentra comúnmente en el ambiente y con frecuencia en la piel, fosas nasales y mucosa de los seres humanos. En la industria alimentaria su contaminación se asocia por la manipulación inadecuada, puesto que puede llegar a los alimentos por medio de los seres humanos. Suelen encontrarse en alimentos como la carne de cerdo durante el proceso de sacrificio, donde la contaminación puede ocurrir en diversas etapas del procesamiento (Zhu et al., 2023).

1.5.3 Método de recuento microbiológico

El recuento microbiológico determina la cantidad de microorganismos presentes en una muestra, lo cual es crucial en sectores como la industria alimentaria, farmacéutica y clínica.

Los métodos tradicionales, incluyen técnicas como el cultivo en placa, suelen ser lentos y laboriosos, ya que requieren un tiempo considerable para el crecimiento de los microorganismos y su posterior identificación. Aunque tienen la capacidad de conservar microorganismos para estudios futuros, estos métodos son limitados en su capacidad para manejar organismos de crecimiento lento (Ivashko et al., 2023).

Las placas MicroFast®, Meizheng BIO- TECH (2022), son herramientas utilizadas en métodos de recuento microbiológico, están diseñadas para automatizar y acelerar la detección

de microorganismos, siendo su uso común en industrias que requieren un monitoreo microbiológico eficiente. Estos métodos rápidos son validados siguiendo métodos alternativos para demostrar que son equivalentes en cuanto a desempeño a métodos de referencia oficiales como la FDA/BAM, ISO u otros. Por último, este proceso de demostración las lleva a obtener certificaciones como las AOAC®.

1.5.4 Normas ISO

Las normas ISO son estándares de carácter internacional elaborados por la Organización Internacional de Normalización (2024), cuya finalidad es describir la mejor manera de realizar algo, esto puede referirse a la fabricación de productos, la gestión de un proceso o servicio.

La norma ISO 16140-3 (2021), establece el protocolo a seguir para verificar métodos microbiológicos que ya han sido validados. El objetivo de esta normativa es asegurar que un laboratorio pueda implementar de forma correcta un método validado, pero en sus propias condiciones. Define métodos cuantitativos y cualitativos para poder evaluar el rendimiento del método en sensibilidad, especificidad y exactitud.

1.5.5 Validación de métodos

La ISO 16140-3 (2021) define la validación de métodos como un proceso donde se demuestra que se cumple con requisitos de desempeño de un método y se demuestra que cumple el uso previsto específico. La validación lo realiza la entidad que desarrolla el método, los cuales pueden ser un organismo normativo o el fabricante de este. Estos métodos siguen ensayos que se realizan en condiciones controladas de laboratorio para que el método sea aceptado oficialmente o por normativas.

1.5.6 Verificación de métodos

Los laboratorios destinados a realizar ensayos deben tener un sistema de gestión de calidad, mismo que se desarrolla en base a la ISO 17025, la cual exige al laboratorio la validación y verificación de métodos para análisis. Es así como la ISO 16140-3 (2021) ofrece un protocolo para poder realizar verificaciones de métodos, métodos previamente descritos por organizaciones como: la Organización Internacional de Normalización (ISO) y el Comité Europeo de Normalización (CEN).

1.5.7 Verificación en artículos alimentarios

Según la ISO 16140-3 (2021), se define que la verificación de artículos alimentarios, también llamado verificación de matrices alimentarias, es un proceso que realizan los laboratorios para demostrar que pueden efectuar de forma correcta la verificación de un método validado. De acuerdo con esto, deben levantar información donde se compruebe que pueden analizar alimentos en las condiciones específicas del laboratorio usuario.

La ISO 16140-3 (2021) menciona que la verificación de matrices alimentarias se debe realizar en matrices difíciles, lo que significa que se deben elegir alimentos que presenten características que puedan interferir en el aislamiento, detección o cuantificación de microorganismos en un ensayo. Características tales como: microbianas, físicas y químicas, entre estas pueden ser alimentos muy grasosos, con pH elevados, muy pigmentados o productos que hayan pasado por procesos de pasteurización, esterilización o deshidratación.

1.5.8 Reproducibilidad de métodos microbiológicos.

La reproducibilidad de los métodos microbiológicos sirven para garantizar la fiabilidad de los resultados en estudios (Hernández & Samayoa, 2024). La crisis de reproducibilidad que enfrenta la ciencia, incluida la microbiología, se debe en gran medida a la falta de transparencia en los métodos y resultados, lo que complica la reproducción de estudios previos y plantea desafíos técnicos y sociales para investigadores (Schloss, 2018).

Debido a este antecedente Moossavi et al. (2021) menciona que para mejorar la reproducibilidad de los métodos microbiológicos se requiere una atención constante a los controles de calidad y a la transparencia metodológica, algo que puede lograrse mediante el desarrollo de estándares bien definidos y la aplicación de algoritmos estadísticos robustos.

Capítulo 2

2. Metodología

En este capítulo se presenta el procedimiento que se llevó a cabo para alcanzar los objetivos planteados en el capítulo anterior. El enfoque de este proyecto es verificar un método rápido, se realizó un recuento de múltiples células bacterianas provenientes de muestras alimentarias. Para este ensayo se cuantificó *Staphylococcus aureus*, usando el protocolo para la verificación de métodos de la norma ISO 16140-3:2021 y los datos de validación proporcionados por el fabricante del método a evaluar, empresa que distribuye placas MicroFast®. Dicho estudio de validación se realizó en base al método de referencia de la FDA/BAM, (2016), capítulo 12: *Staphylococcus aureus*, y proporciona valores de desviación estándar, cumpliendo así con el programa AOAC performance Tested Method 122102.

El procedimiento se divide en dos etapas: verificación de la implementación y verificación de artículos alimentarios.

2. 1 Etapa 1: Verificación de la implementación

El procedimiento que se llevó a cabo para esta etapa sigue el protocolo establecido por la norma ISO 16140, parte 3, punto 6, que detalla las pautas a seguir para la verificación de métodos cuantitativos, destacando que solo la desviación estándar de reproducibilidad es aplicable para la verificación de la implementación, cuya finalidad es demostrar que el laboratorio es capaz de implementar el ensayo en sus instalaciones (ISO 16140-3, 2021).

2. 1.1 Selección de matriz alimentaria

El ensayo consistió en analizar una matriz alimentaria aplicando el procedimiento que se detalla en el estudio de validación del método rápido para recuento de *Staphylococcus aureus* en placas MicroFast®. La norma específica que deben usarse al menos diez muestras de una misma matriz alimentaria que pertenezcan a lotes diferentes, y también menciona como sugerencia que pueden utilizarse un mayor número de muestras para cubrir posibles

variaciones de resultados debido a errores prácticos dentro del ensayo. Es así como para esta verificación se empleó doce muestras de jamón.

2.1.2 Preparación de cepa

Se utilizó cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538), proveniente de un banco de reserva, almacenada en crioviales que se encontraban disponibles en el laboratorio y conservadas a -20°C aproximadamente en un congelador (marca AMS, modelo AMS 150, serie 20040187). Se descongeló el criovial el cual contenía perlas criogénicas impregnadas con la cepa bacteriana y se sembró dentro de una cabina de flujo laminar (marca BIOBASE, modelo BBS-SDC, serie BBSY15IVVD221200117A, fabricante BIOBASE Biodustry Co., Ltd., China) en placa de agar PCA (Plate Count Agar) por estrías con técnica de agotamiento para aislar las colonias, luego por medio de una incubadora (marca BIOBASE, modelo BJPX-HT300, serie 9011807, fabricante BIOBASE Biodustry Co., Ltd., China) se incubó a temperatura de 36°C por 24 a 48 horas.

2.1.3 Preparación del inóculo

Se preparó el inóculo con microorganismos de *Staphylococcus aureus* a partir de colonias aisladas en placa. Se ajustó una concentración experimental de 4.6×10^7 UFC/mL, mediante la evaluación de la turbidez con ayuda de un fotómetro multiparamétrico (marca HANNAH, modelo HI83399-01, serie ACD0425022) a una longitud de onda de 610 nm. Se consideró que la absorbancia se encuentre entre 0.08 y 0.1 nm. Para esto, se inoculó con ayuda de un asa dos tubos que contenían 20 mL de BPBW (Agua de dilución tamponada con fosfato de butterfield) cada uno, se tomaron colonias aisladas en PCA, se homogenizó con ayuda de un vortex (marca BIOBASE, modelo MX-S, serie VB192AH0011672, fabricante BIOBASE Biodustry Co., Ltd., China) y luego se tomó una alícuota de 10 mL (BPBW más inóculo) por cada tubo con ayuda de una micropipeta (marca FISHERBRAND, modelo Finnpiptette II, serie JU16339, fabricante Thermo Fisher Scientific) para evaluar la densidad

óptica en el fotómetro multiparamétrico hasta alcanzar la absorbancia previamente mencionada.

Luego, se realizó 2 diluciones seriadas de 1:10 del inóculo para obtener un inóculo de trabajo con carga aproximada de 4.6×10^5 UFC/mL. La cantidad de inóculo necesario para la contaminación artificial de las muestras fue de 0.108 mL $\approx$ 108 μ L durante el ensayo. Este dato se obtuvo mediante la ecuación 1, tomando en cuenta la concentración del inóculo de trabajo mencionado previamente y la concentración final deseada, 100 UFC/mL, en un volumen total de 500 mL (diluyente + muestra) (el cálculo realizado se encuentra en el Apéndice B).

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

C_1 : concentración inicial de la solución (UFC/mL)

V_1 : volumen para contaminar muestras (mL)

C_2 : concentración deseada (UFC/mL)

V_2 : volumen total de la dilución (mL)

2.1.4 Verificación de carga natural de la muestra

Las doce muestras fueron analizadas con la finalidad de conocer su carga bacteriana inicial, de tal manera que esto no interfiera en los resultados finales de la verificación de la implementación. Se tomó 50 g de jamón, se agregó 450 mL de BPBW y se homogenizó. Posteriormente, se realizó una dilución y se sembró las diluciones 10^1 y 10^2 , se empleó 1 mL de cada dilución para depositar placa MicroFast®, esto se realizó por duplicado y se incubó a 36°C por 24 horas.

2.1.5 Contaminación de muestra

Siguiendo con el protocolo de la norma, a partir de aquí se utilizó dos analistas para la experimentación, analista A y analista B, y todo se realizó de manera independiente; cada uno utilizó su propia pipeta; pipeta 1 (), pipeta 2 (), y cabina de flujo laminar; cabina 1 (), cabina 2 (), las cuales serán las condiciones variables dentro del ensayo. La contaminación de las doce muestras de jamón se llevó a cabo de la siguiente manera: cada analista pesó 50 g de jamón y agregó 450 mL de diluyente de BPBW, tal como lo menciona el estudio de validación del fabricante, esto se homogenizó con ayuda de un stomacher (marca BIOBASE, modelo BK-SHG05, serie 202005983, fabricante BIOBASE Biodustry Co., Ltd., China). Luego, cada muestra se contaminó con 108 μ L del inóculo de trabajo que contenía *S. aureus*. Una vez que se realizó esto, cada analista sembró en placas MicroFast® por duplicado tomando 1 mL de muestra ya contaminada y se incubó a 36°C por 24 horas.

Además, se realizó un control de carga del inóculo de trabajo para confirmar la concentración real del mismo, esto se realizó mediante la contaminación de una bolsa que contenía 500 mL de diluyente, pero no contenía muestra (jamón) y se sembró 1 mL en una placa Petri estéril vacía a profundidad, se vertió medio fundido de PCA entre 15-20 mL, se homogenizó con movimientos circulares para asegurar la distribución del inóculo y se incubó a 36°C por 24 horas.

2.1.6 Recuento de colonias

Se realizó el conteo en placas MicroFast®, el rango estimado de conteo es de 15 a 150 colonias por placa. Los recuentos de los duplicados se promedian de manera independiente para el analista A y B, luego se multiplicaron por el factor de dilución para conocer los UFC/g. Posteriormente, los resultados se llevaron a $\log_{10}$ para el manejo de datos y obtener los resultados en escala logarítmica ($\log_{10}$ UFC/g) de las muestras inoculadas.

2.1.7 Evaluación de resultados

Con los resultados obtenidos, se realizó una desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR}) con los resultados de doce muestras (ISO 16140-3, 2021). Para esto se utilizó la ecuación 2 donde se suman las diferencias cuadráticas entre los $\log_{10}$ de los recuentos que se obtuvieron para cada replica en las doce muestras. Los datos fueron procesados mediante hoja de cálculo de Microsoft Excel versión 2507.

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

S_{IR} : desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio

i: índice de muestras

n: número de muestras procesadas

y_{iA}, y_{iB} : $\log_{10}$ de los recuentos obtenidos por analista A y B en condiciones diferentes

2.1.8 Límite de aceptación

Para evaluar los resultados obtenidos, se comparó el S_{IR} del ensayo realizado con el S_R , valor de desviación estándar del estudio de validación del fabricante, los cuales deben satisfacer la ecuación 3 (ISO 16140-3, 2021). Una vez que se cumplió con lo dispuesto, se inició la segunda etapa.

$$S_{IR} \text{ (método verificado)} \leq 2 \times S_R \text{ (método validado)} \quad (\text{Ec. 3})$$

2.2 Etapa 2: Verificación de artículos (alimentos)

La verificación de los artículos, matrices alimentarias, se realizó para demostrar que el laboratorio es capaz de ejecutar el ensayo verificado con los artículos que se analizan en el

laboratorio frecuentemente, siguiendo el protocolo de la norma ISO 16140-3. Para esto, se determinó un sesgo estimado (eBias), aplicable solo para la verificación de artículos, la cual tiene la finalidad de determinar la diferencia que existe entre la concentración de inóculo usado y la concentración en las muestras contaminadas artificialmente, cuyo valor debe ser menor a 0.5 Log_{10} (ISO 16140-3, 2021).

2.2.1 Selección de matrices alimentarias

Se seleccionó un alimento representativo para cada una de las seis categorías diferentes, de acuerdo con la ISO 16140-3 y el estudio de validación entregado por el fabricante. Este último, muestra que la validación se realizó en cinco categorías de alimentos, es así como, de acuerdo con la norma, a partir de este número de categorías, el laboratorio usuario puede definir libremente la cantidad de categorías a evaluar en el ensayo. Entre las categorías que se evaluaron, cinco pertenecen al estudio de validación más una adicional, la cual se seleccionó a criterio del laboratorio usuario.

Se consideró matrices difíciles, alimentos que pueden complicar el análisis microbiológico debido a pH elevado, alto contenido en grasa, azúcares, o textura (ISO 16140-3, 2021), para extender el alcance de verificación. Esto permite que el método se verifique para una amplia gama de alimentos según lo mencionado por la norma, es decir, el método no se limita a una categoría alimentaria y puede ser utilizado para diferentes productos. Los alimentos que se analizaron se mencionan en la tabla 1.

Tabla 1*Alimentos utilizados en la verificación de artículo*

Categoría	Alimento
Frutas, verduras y hortalizas transformadas	Fruta confitada
Pescado y marisco crudo y listo para cocinar (sin procesar)	Atún crudo congelado
Verduras y hortalizas, semillas, frutos secos, fruta y cereales secos	Banano deshidratado
Productos cárnicos listos para comer, listos para calentar	Jamón
Fruta y productos frescos	Pulpa de mango
Leche y productos lácteos sometidos a tratamiento térmico	Yogurt

Nota. Los alimentos son elegidos por el laboratorio y las categorías son definidas por la normativa ISO 16140-3 (2021).

2.2.2 Preparación de inóculo y contaminación de muestra

Se preparó el inóculo para contaminar las muestras con *Staphylococcus aureus*. Para esto, se usó un tubo de 10 mL de BPBW que contenía una carga de 4×10^7 UFC/mL. A partir de esto, se realizó seis diluciones seriadas de 1:10 para obtener diferentes cargas de trabajo, de las cuales se eligió tres, nivel alto, medio y bajo como se observa en la tabla 2.

A continuación, se realizó la contaminación artificial de las seis muestras, luego de haber realizado una verificación de carga natural de cada una de estas, control negativo. Luego, se realizó la contaminación artificial, se preparó la muestra, 50 g de alimento más 450 mL de diluyente, se homogenizó, y se tomó un alícuota de 1 mL para contaminar la solución de acuerdo con cada nivel como se especifica en la tabla 2.

Tabla 2*Niveles de inoculación en las muestras*

	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto
Carga de inóculo	4×10^3 UFC/mL	4×10^5 UFC/mL	4×10^7 UFC/mL
Alimentos	Fruta confitada	Banano deshidratado	Pulpa de mango
	Yogurt	Jamón	Pescado Atún

Nota: Los niveles fueron seleccionados en base a la experiencia del laboratorio en cuanto a manejo de cargas y los alimentos fueron distribuidos para cada nivel por preferencia del laboratorio.

Posteriormente, se realizó los respectivos cálculos para identificar cuántas diluciones se debían realizar y poder sembrar las muestras. Se buscó obtener una carga deseada por cada nivel, para lo cual se empleó la ecuación 1, los cálculos se encuentran detallados en el Apéndice B. Luego, para obtener el recuento estimado deseado se realizó diluciones de acuerdo con el caso. En cada nivel, se tomó 1 mL de muestra y se sembró por duplicado en placas MicroFast® de la siguiente manera, para el nivel alto, se sembró la dilución 10^{-1} ; para el nivel medio, se realizó una dilución y se sembró 10^{-2} , por último, para el nivel alto, se realizó tres diluciones y se sembró 10^{-4} . Finalmente, se espera obtener conteos aproximados a los reportados en la tabla 3.

Tabla 3*Recuento estimado por gramo de alimento*

	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto
Resultado esperado	8×10^1 UFC/g	8×10^3 UFC/g	8×10^5 UFC/g

Nota. Estos valores corresponden a datos teóricos que se espera obtener al contaminar las muestras con *S. aureus*.

Al mismo tiempo, se contaminó tres bolsas con 500 mL de WPW, sin matriz alimentaria, empleando 1 mL de inóculo con los diferentes niveles establecidos, enseguida se

sembró en placa Petri, agar PCA a profundidad y se incubó a 36°C por 24 h con la finalidad de obtener resultados comparativos.

2.2.3 Recuento

Se realizó el recuento en placas luego de 24 horas, los resultados obtenidos por duplicado se promediaron y fueron expresados inicialmente en UFC/mL, es así como, se estableció una relación de 1:10 y los resultados finales se expresaron en UFC/g de alimento.

2.2.4 Evaluación de resultados

Por cada nivel, se realizó una comparación de los datos obtenidos, esto a partir del recuento del análisis de las muestras contaminadas con el recuento obtenido de la suspensión con inóculo, sin matriz alimentaria, que se sembró (ISO 16140-3, 2021). Para esto, los resultados del control negativo pueden ayudar con información para el ajuste de datos en caso de que las muestras hayan tenido carga microbiana inicial por naturaleza.

La comparación debe estar sujeta a la ecuación 4, la diferencia absoluta entre la suspensión del inóculo y la carga de la matriz alimentaria inoculada artificialmente debe ser menor que 0.5 Log₁₀ para que el método sea aceptado en diferentes tipos de alimentos (ISO 16140-3, 2021).

$$\left| \log_{10} \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} (\text{inóculo}) - \frac{\text{promedio log}_{10}}{\text{porcion de ensayo}} \right| \leq 0.5 \log_{10} \text{ para cada nivel de inoculación } \quad (\text{Ec.4})$$

Capítulo 3

3. Resultados y análisis

En este capítulo se detallará los resultados obtenidos en la verificación de la implementación del método de ensayo y la verificación de artículos, esta última se realizó en seis alimentos que pertenecían a diferentes categorías según lo indicado por la norma ISO 16140-3:2021.

3.1 Etapa 1: Verificación de implementación

3.1.1 Controles

Se evaluó la carga natural de doce muestras de jamón (control negativo), la cual pertenece a la categoría de “productos cárnicos listos para comer, listos para calentar” (ISO 16140-3, 2021), luego de identificar el alcance y los alimentos que fueron utilizados en el estudio de validación de recuento de *Staphylococcus aureus* (SA) en placas MicroFast® (Ver tabla 8). Se escogió este alimento ya que fue empleado en dicho estudio, y a su vez la norma establece que, para métodos alternativos, como este método rápido, se debe seguir un protocolo de verificación a partir de un estudio de validación, para este caso, el método rápido de placas MicroFast® ha sido certificado por la AOAC Research Institute (2024).

El conteo en placas se tabuló en el Apéndice C, Tabla 15. Los resultados obtenidos para las muestras evidenciaron una carga microbiana menor a 10 UFC/g como se puede observar en la Tabla 4. La norma ISO 16140-3 (2021) menciona que se debe realizar una comprobación de matrices y en darse el caso de tener una carga menor a 10 UFC/g se establece una contaminación artificial de *Staphylococcus aureus* en las muestras.

Es importante realizar la evaluación de las matrices, denominadas control negativo, dado que, en varias ocasiones, los resultados se obtienen al restar las lecturas de las muestras control con las lecturas de las muestras contaminadas. Un estudio realizado por Munno et al. (2023), menciona estos controles actúan como herramientas activas para detectar contaminación, de tal manera que se asegure que los datos reportados reflejen solo el

contenido o carga real de la muestra contaminada. En casos de que ya exista presencia de *Staphylococcus aureus* en los alimentos que se usaron para el ensayo, la concentración de microorganismos podría aumentar y generar un conteo final mucho más alto al esperado.

Tabla 4

Carga microbiana natural de las muestras de jamón

Muestra	UFC/g
1	< 10
2	< 10
3	< 10
4	< 10
5	< 10
6	< 10
7	< 10
8	< 10
9	< 10
10	< 10
11	< 10
12	< 10

Nota. Datos obtenidos a partir de doce muestras de jamón de diferentes lotes.

Por otro lado, se comprobó la carga microbiana del diluyente previo a su uso en el ensayo, esto determinó que el medio líquido se encontraba estéril, observar la Tabla 5. Además, se evaluó la carga del inóculo a usarse en la contaminación artificial para obtener la concentración real, esta muestra presentó una carga microbiana de 370 UFC/mL aproximadamente, la cual será comparable con la carga obtenida en las muestras inoculadas artificialmente.

Estos resultados son de alta importancia, ya que aseguran que no exista una contaminación cruzada. Los insumos que se usan en los ensayos deben garantizar la ausencia

microbiológica para evitar que influya en el mismo, estos presentan resultados conformes, por esta razón son aptos para su uso.

Tabla 5

Control de carga inóculo y control de esterilidad del diluyente

Insumo utilizado	UFC/mL
Diluyente	< 10
Inóculo de trabajo + diluyente	370

Nota. Para confirmar la concentración real del inóculo se colocó 108 µL en 500 mL de diluyente

Todos estos controles se realizaron previo a iniciar con el ensayo, cuya finalidad es asegurar la fiabilidad y trazabilidad de los resultados obtenidos en la verificación de implementación del método analítico. Asimismo, se aseguró que todos los equipos a utilizarse en la prueba se encontraban debidamente calibrados o caracterizados según como lo declara la norma ISO 17025:2017, los cuales se encuentran listados en el Apéndice A, Tabla 12.

3.1.2 Resultados del ensayo de verificación

Las muestras fueron contaminadas artificialmente y sembradas en placas MicroFast® por duplicado, se obtuvo el recuento en placa de *Staphylococcus aureus*, estos datos se encuentran tabulados en Anexos C, Tabla 16 y 17. A partir de estos datos primarios, se realizó un promedio del conteo para el analista A y analista B. A continuación, los resultados se expresan en la Tabla 6, los cuales son tratados bajo el factor de dilución utilizado (1:10).

Tabla 6

Resultados de carga de las muestras de jamón contaminadas expresados en 10¹

Muestra	Analista A (y_{iA})	Analista B (y_{iB})
	UFC/g	UFC/g
1	370	450
2	375	405
3	430	390
4	400	450
5	455	490
6	560	445
7	460	430
8	340	350
9	425	375
10	490	485
11	460	345
12	460	460

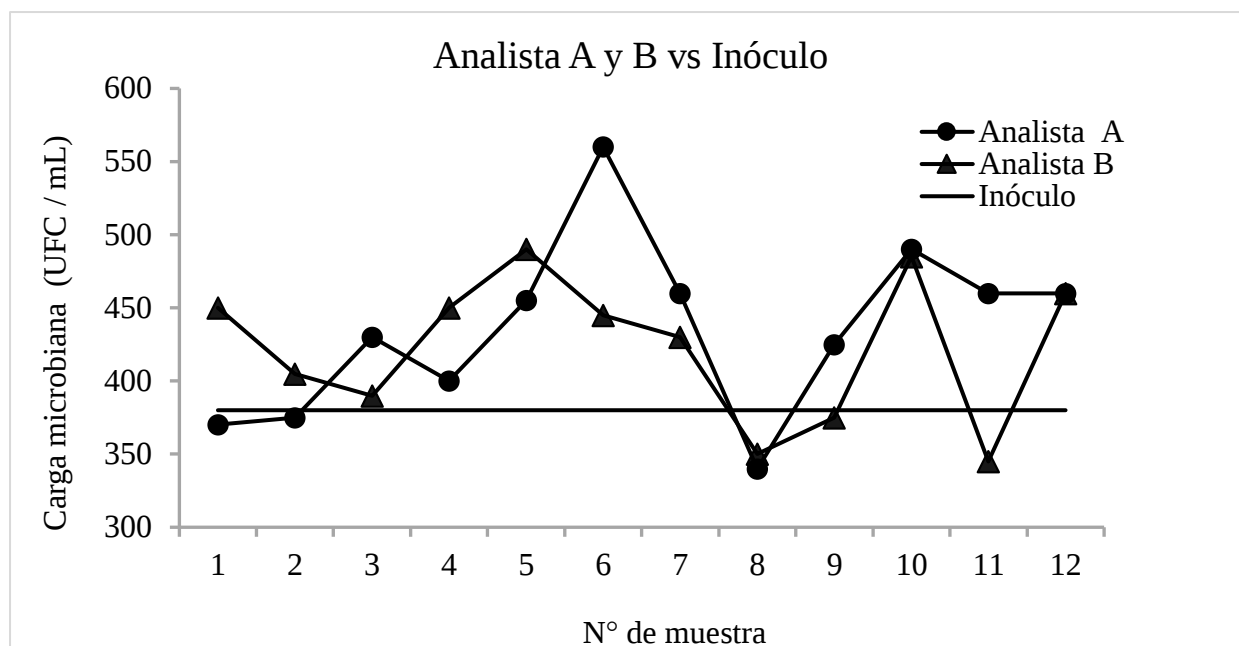
Nota. Los resultados corresponden al promedio de los recuentos de las doce muestras contaminadas artificialmente con un volumen de 108 μ L de inóculo preparado con *S. aureus*.

Los datos recolectados en el ensayo muestran un comportamiento variable, ver figura 1, la línea tendencia entre analista A y B describen el recuento obtenido de las doce muestras inoculadas, frente al conteo que se obtuvo del inóculo más el diluyente que fue evaluado previamente.

De acuerdo con la norma ISO 16140-3 (2021), los datos que demuestren demasiada variabilidad se excluyen de los cálculos que se realicen, en este caso, ninguno afecta los resultados, por lo tanto, se emplean todos los datos obtenidos para el análisis estadístico.

Figura 1

Gráfica Analista A y Analista B vs la carga control del inóculo



Nota. La figura muestra la tendencia de los datos obtenidos por el analista A y B del análisis de las doce muestras de jamón inoculadas con 108 μL de inóculo preparado con *S. aureus* que poseía una carga de 4.6×10^5 UFC/mL.

En la Tabla 7, se observan los resultados de desviación estándar del ensayo realizado en el laboratorio, los datos de conteo se convirtieron a valores logarítmicos ($\log 10$) y se obtuvo una diferencia absoluta entre analista A y B, luego se eleva al cuadrado y se obtiene la desviación estándar (S_{IR}) siguiendo la ecuación 2.

Tabla 7

Desviación estándar (S_{IR}) del ensayo realizado en el laboratorio

Muestra	Log₁₀ A (y_{iA})	Log₁₀ B (y_{iB})	$ y_{iA} - y_{iB} $	Diferencia al cuadrado
1	2.568	2.653	0.08501	0.00723
2	2.574	2.607	0.03342	0.00112
3	2.633	2.591	0.04240	0.00180
4	2.602	2.653	0.05115	0.00262
5	2.658	2.690	0.03218	0.00104
6	2.748	2.648	0.09983	0.00997
7	2.663	2.633	0.02929	0.00086
8	2.531	2.544	0.01259	0.00016
9	2.628	2.574	0.05436	0.00295
10	2.690	2.686	0.00445	0.00002
11	2.663	2.538	0.12494	0.01561
12	2.663	2.663	0.00000	0.00000
S_{IR}				0.04250528

Nota. Los resultados corresponden al cálculo realizado en base al conteo de colonias que se registraron para los dos analistas, los cuales utilizaron diferentes equipos de trabajo (pipeta y cabina de flujo laminar).

La Tabla 8 presenta los resultados del estudio de validación de *Staphylococcus aureus* (SA) en placas MicroFast® facilitados por el fabricante. Los valores de S_R son multiplicados por 2 para cumplir con el criterio de la ecuación 3. La norma pide comparar el S_{IR} con el valor más bajo de la desviación estándar (S_R) del estudio de validación. El valor más bajo para este conjunto de datos fue 0.044.

Tabla 8*Datos obtenidos en el estudio de validación*

Muestra	Matriz	S _R	2 x S _R
1	Leche de vaca entera no pasteurizada (cruda)	0.168	0.336
		0.086	0.172
		0.043	0.086
2	Pastel de crema	0.199	0.398
		0.039	0.078
		0.048	0.096
3	Pescado congelado	0.068	0.136
		0.168	0.336
		0.062	0.124
4	Jamón	0.133	0.266
		0.063	0.126
		0.040	0.080
5	Ensalada de pasta fresca con verduras	0.184	0.368
		0.022	0.044
		0.062	0.124
		2 x S _R min	0.044

Nota. Datos tomados del estudio de validación de las placas (AOAC Research Institute, 2020)

La norma indica que se debe comparar los datos de reproducibilidad del ensayo con el estudio de validación. Es importante mencionar que, la reproducibilidad al ser la variación que se da en el sistema de medición, cuando diferentes operadores/analistas miden lo mismo por varias veces (Lopez, 2020), al considerar tales variaciones estos valores tienden a ser mucho más elevados si se llegan a comparar con datos de repetibilidad.

Finalmente, se determina que el valor obtenido en el ensayo del laboratorio es comparable con los datos del estudio de validación de las placas MicroFast®. Se puede observar a través de la ecuación 3 que el valor generado en el ensayo de verificación es

menor que $2 \times S_R$ min, el cual fue determinado en el estudio de validación del fabricante, razón por la cual se comprueba que se cumple con lo planteado en el protocolo de verificación de la implementación garantizando así la precisión del método.

$$\begin{aligned} S_{IR} &\leq 2 \times S_R \\ 0.042 &\leq 0.044 \end{aligned} \quad \text{Ec (3)}$$

3.2 Etapa 2: Verificación de artículos (alimentos)

Una vez que se ha completado el ensayo de verificación y este se cumple con éxito de acuerdo con la norma ISO 16140-3:2021, se ejecutó el protocolo para la verificación de artículos, evaluando así el desempeño del método en diferentes tipos de muestras.

3.2.1 Controles

Los resultados microbiológicos obtenidos para las muestras de yogurt, fruta confitada, jamón, banano deshidratado, pulpa de mango y atún crudo congelado muestran una carga inferior a 10 UFC/mL como se observa en la Tabla 9 (los datos primarios de conteo se observan en el apéndice C, Tabla 18). La carga microbiana baja que se obtiene de los productos analizados indica que se encuentran dentro de parámetros aceptables de higiene. Además, debido a que todas las muestras presentan valores por debajo del límite de detección, se determina que no influyen, ni interfieren en el conteo realizado en la verificación de estos alimentos, garantizando así la validez del control realizado.

Tabla 9*Carga microbiana de las muestras control*

Muestra	UFC/mL
Yogurt	< 10
Fruta confitada	< 10
Jamón	< 10
Banano deshidratado	< 10
Pulpa de mango	< 10
Atún crudo congelado	< 10

Nota. Datos obtenidos de cada matriz alimentaria a utilizar en el ensayo que fueron sembradas por duplicado.

Al igual que la primera etapa (verificación de la implementación), en esta también se verificó y se confirmó la esterilidad del diluyente a usar en el ensayo, ver Tabla 10.

Tabla 10*Control de carga microbiana del diluyente*

Muestra	UFC/mL
Diluyente	< 10

3.2.1 Resultados del ensayo de verificación de artículos

En la Tabla 11 se presentan los resultados obtenidos durante la verificación, la cual fue aplicada a seis matrices diferentes de alimentos. Las seis matrices se distribuyeron entre los tres niveles de contaminación artificial; bajo, medio y alto. Se aplicó una contaminación controlada mediante la inoculación de una concentración conocida de microorganismos de *Staphylococcus aureus* (Ver Apéndice A, Tabla 16, datos primarios)

A continuación, se realizó el análisis microbiológico para obtener el recuento final de unidades formadoras de colonias UFC/g o mL, con el fin de evaluar la recuperación del

inóculo, es decir, que tan efectivo es el método para recuperar los microorganismos que fueron inoculados en las seis muestras utilizadas en el ensayo.

Los resultados expresan tanto el promedio del recuento final obtenido en laboratorio como el promedio del inóculo utilizado para cada muestra, estos datos fueron obtenidos a partir del conteo en placa que se reporta en el Apéndice C, Tabla 19 y 20. Ambos valores fueron expresados en logaritmo (Log_{10}), lo que permite trabajar en una escala más adecuada para comparaciones estadísticas y de sesgo.

Los datos obtenidos permitieron el cálculo del sesgo estimado (eBias), definido como la diferencia entre el logaritmo del resultado del ensayo y el logaritmo del inóculo ($\text{eBias} = \text{Log}_{10} \text{ resultado} - \text{Log}_{10} \text{ inóculo}$), siguiendo los lineamientos establecidos por la norma.

Tabla 11

Resultados obtenidos del ensayo en las seis categorías propuestas

Matriz Alimentaria	Nivel contaminación	Resultado de matriz contaminada UFC/g o mL	Resultado de Inóculo UFC/g o mL	Log₁₀ matriz	Log₁₀ inóculo	eBias
Yogurt	Bajo	90	50	1.95	1.70	0.26
Fruta confitada	Bajo	65	25	1.81	1.40	0.41
Jamón	Medio	7400	6500	3.87	3.81	0.06
Banano deshidratado	Medio	7300	6050	3.86	3.78	0.08
Pulpa de mango	Alto	361500	655000	5.56	5.82	0.26
Atún crudo congelado	Alto	565000	685000	5.75	5.84	0.08

Nota. El dato de eBias es la diferencia entre los resultados de matriz contaminada artificialmente y el inóculo (resultado obtenido del control del inóculo)

El resultado del valor de eBias permitió determinar el nivel de sesgo sistemático que existe en cada matriz. En el caso del yogurt y la fruta confitada, ambos un nivel bajo de contaminación, se obtuvieron valores de eBias de 0.26 y 0.41 respectivamente, se puede observar que existe una ligera sobreestimación del método, esto quiere decir que, la carga del de las matrices contaminadas supera la carga real del inóculo, pero se encuentran por debajo de 0.5 Log₁₀, cumpliendo así con el criterio establecido en el capítulo anterior.

El yogurt fue considerado dentro de las matrices difíciles en este ensayo debido a sus propiedades fisicoquímicas, reológicas y microbiológicas. De acuerdo con un estudio realizado por Wang et al., (2025), puede ser difícil recuperar microorganismos a partir de esta matriz por su pH que es bastante ácido, también por la presencia de cultivos iniciadores propios del producto y metabolitos que puede reducir la supervivencia de las células inoculadas. Por otro lado, se considera que la fruta confitada posee una composición compleja, es un alimento con bajo contenido de agua y alto contenido de azúcar, posee una textura viscosa y pegajosa que puede dificultar la homogenización de la muestra y esto puede interferir en la recuperación de microorganismos por la falta de distribución del inóculo (Berthold-Pluta et al., 2021). Sin embargo, este ensayo demuestra que no existió tal dificultad según los datos obtenidos.

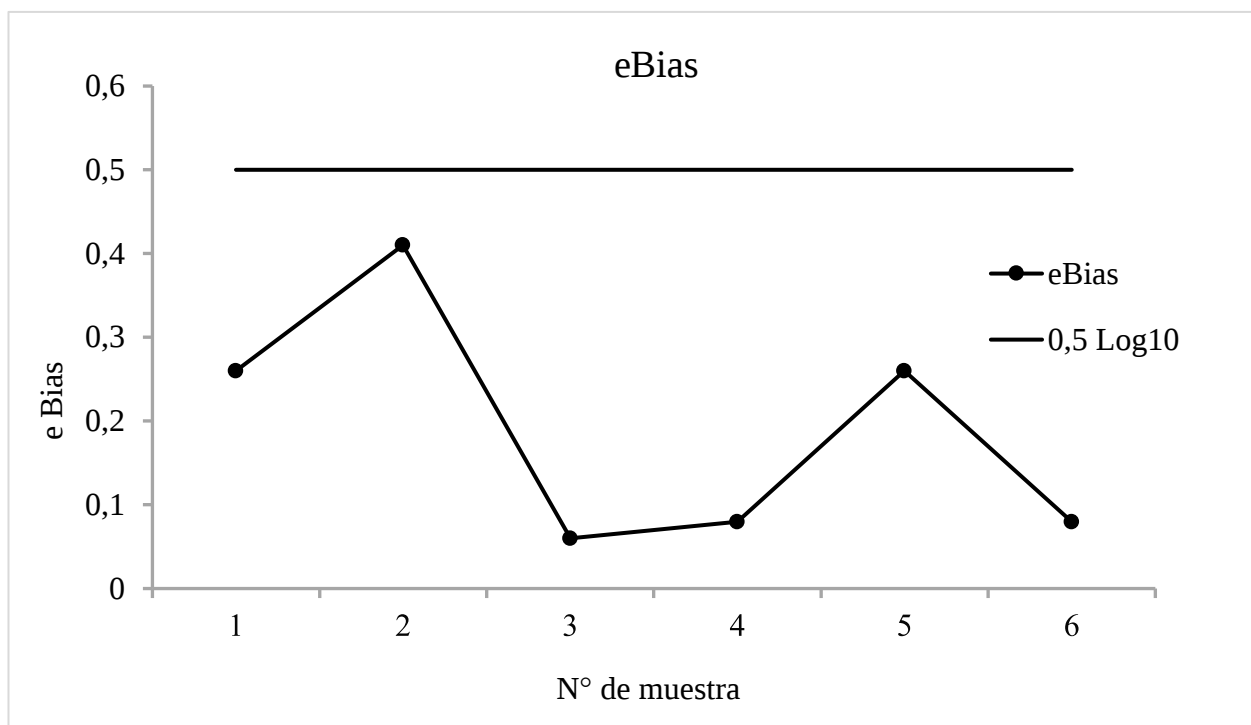
En matrices con nivel medio de contaminación, como el jamón y el banano deshidratado, los valores de eBias fueron de 0.06 y 0.08 respectivamente, estos valores son mucho más bajos que el nivel anterior. Se consideraron matrices difíciles, puesto que el jamón, posee un alto contenido de grasa y conservantes como nitritos y nitratos, lo que podrían convertirse en barreras negativas y afectar el análisis microbiológico (Chaillou et al., 2022). Asimismo, el banano, la principal dificultad que se puede encontrar en este producto es la coloración de la matriz, la misma que puede pigmentar la dilución y que al momento de

contar las colonias no permita diferenciar entre una pigmentación y las colonias generando confusión.

En cuanto a las matrices con alto nivel de contaminación, la pulpa de mango presentó un valor de eBias de 0.26 y el atún crudo congelado, 0.08, lo que indica que hay una variación mínima, los valores significativamente se acerca un valor real, y se cumple con el criterio. Para este caso, la pulpa de mango contiene azúcares, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, esto puede inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos. Y, por último, el atún al ser un alimento congelado existe el riesgo de aumento de carga microbiana debido a que el producto debe descongelarse previo a su análisis.

Figura 2

Resultado de eBias vs la carga teórica del inóculo



Nota. Muestra 1 = Yogurt; muestra 2 = Fruta confitada; muestra 3 = Jamón; muestra 4 = Banano deshidratado; muestra 5 = Pulpa de mango; muestra 6 = Atún crudo congelado
0,5 log10 = límite aceptable en escala logarítmica.

La ISO 16140-3, determina que un método es aceptado cuando cumple con los criterios de sesgo, es decir, los resultados de eBias son menores a 0.5 Log_{10} . En este estudio, todas las matrices analizadas se mantuvieron por debajo de este valor, es posible identificarlo visualmente en la figura 2, cumpliendo así con la ecuación 4 que se presenta en el capítulo anterior. Esto comprueba que no existe una diferencia significativa entre el recuento obtenido por el método en evaluación y el valor del inóculo, garantizando así la veracidad del método.

Finalmente, esto confirma que el método verificado presenta un buen desempeño en términos de exactitud, sin evidencias de sobreestimación o subestimación significativas en ninguna de las condiciones evaluadas.

Capítulo 4

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Al finalizar con el ensayo propuesto al inicio de este proyecto, y siguiendo el protocolo de la norma ISO 16140-3 se obtienen las siguientes conclusiones:

- La verificación de implementación, mediante la cual se comparó la desviación estándar del ensayo realizado (S_{IR}) con la desviación estándar del estudio de validación del fabricante (S_R), se evidenció que el ensayo cumple con el criterio descrito por la norma ISO 16140-3, por lo que se demuestra que el laboratorio posee la competencia técnica y las condiciones necesarias para ejecutar el método en sus instalaciones bajo la categoría de alimento estudiada en la fase 1.
- La verificación de artículos, mediante la cual se realizó un análisis de sesgo (eBias), demostró que el método verificado obedece al criterio de aceptación del mismo, de tal manera que, no existe diferencia significativa entre el recuento microbiano de las muestras inoculadas artificialmente y la del inóculo real, por lo tanto, se cumple con el requisito de comparación que exige la norma ISO 16140-3.
- Se completa con éxito los ensayos de verificación de la implementación y verificación de artículos para *Staphylococcus aureus* en diferentes categorías de alimentos, lo que permite garantizar la precisión y la veracidad del método. Además, abarcar gran variedad de productos alimentarios para el análisis, independientemente de su complejidad en cuanto a composición matricial, le otorga resultados confiables a las industrias.
- Finalmente, los resultados obtenidos aprueban la implementación del método de manera confiable para determinar *Staphylococcus aureus* con el uso de placas deshidratadas en el laboratorio de análisis de alimentos ubicado en el cantón Durán.

Por lo que el laboratorio puede utilizar la información recabada para continuar con el proceso para pedir un alcance de acreditación.

4.2 Recomendaciones

- Se aconseja tener claro los conceptos de verificación y validación de métodos, ya que ambos procesos se relacionan con la finalidad de asegurar la veracidad de los resultados, pero tienen objetivos, alcances y procesos diferentes lo que puede causar confusión.
- Resulta conveniente evaluar el método a partir de cinco categorías como indica la norma para asegurar que el método verificado es aplicable en cualquier matriz alimentaria, ampliando así el alcance y dando apertura a todas las industrias.
- Podría considerarse aplicar la verificación en la categoría de superficie, ya que el estudio de validación de las placas deshidratadas que cuantifica *Staphylococcus aureus* utiliza dentro de su ensayo una “matriz de tipo superficie”, específicamente una muestra realizada en superficie de acero inoxidable.
- Es importante tener en cuenta que los equipos que se utilicen durante el ensayo deben estar calibrados y/o caracterizados según lo establecido en la norma ISO 17025:2017 para asegurar la validez de resultados.

Referencias

- AOAC Research Institute. (2020). *Validation of the MicroFast® Staphylococcus aureus (SA) Count Plate for Enumeration of S. aureus Bacteria in Selected Foods and on Stainless Steel Environmental Surfaces*.
- AOAC Research Institute. (2024). *MicroFast® Staphylococcus aureus Count Plate (SA), Performance Tested MethodsSM certification number 122102*.
- Bennett, R. W., Hait, J. M., & Tallent, S. M. (2023). *Staphylococcus aureus Infection. Guide to Foodborne Pathogens, Second Edition*, 26–44.
<https://doi.org/10.1002/9781118684856.ch2>
- Berthold-Pluta, A., Garbowska, M., Stefańska, I., Stasiak-Różańska, L., Aleksandrak-Piekarczyk, T., & Pluta, A. (2021). Microbiological Quality of Nuts, Dried and Candied Fruits, Including the Prevalence of Cronobacter spp. *Pathogens 2021, Vol. 10, Page 900, 10(7)*, 900. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10070900>
- Bodie, A. R., Wythe, L. A., Dittoe, D. K., Rothrock, M. J., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2024). Alternative Additives for Organic and Natural Ready-to-Eat Meats to Control Spoilage and Maintain Shelf Life: Current Perspectives in the United States. *Foods 2024, Vol. 13, Page 464, 13(3)*, 464. <https://doi.org/10.3390/FOODS13030464>
- Borin, I. C., Martins, V., & Taketani, N. F. (2021). IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS MICROBIOLÓGICOS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA. *Revista Ensaios Pioneiros, 5(2)*, 20–34. <https://doi.org/10.24933/REP.V5I2.234>
- Chaillou, S., Ramaroson, M., Coeuret, G., Rossero, A., Anthoine, V., Champomier-Vergès, M., Moriceau, N., Rezé, S., Martin, J. L., Guillou, S., & Zagorec, M. (2022). Combination of High-Pressure Treatment at 500 MPa and Biopreservation with a Lactococcus lactis Strain for Lowering the Bacterial Growth during Storage of Diced

Cooked Ham with Reduced Nitrite Salt. *Microorganisms*, 10(2), 456.

<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10020456>

FDA. (2016). *Bacteriological Analytical Manual Chapter 12: Staphylococcus aureus (March 2016 Edition)*. www.fda.gov

Gourama, H. (2020). Foodborne Pathogens. *Food Engineering Series*, 25–49.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-42660-6_2

Hernández, S., & Samayoa, A. (2024). *Validación del método oficial AOAC 986.33 para el recuento de Escherichia coli en leche humana, bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente*.

<https://biblioteca.galileo.edu/xmlui/handle/123456789/1686>

Huang, H., Brooks, B. W., Lowman, R., & Carrillo, C. D. (2015). Campylobacter species in animal, food, and environmental sources, and relevant testing programs in Canada.

Https://Doi.Org/10.1139/Cjm-2014-0770, 61(10), 701–721.

<https://doi.org/10.1139/CJM-2014-0770>

ISO 16140-3. (2021). *Validación de métodos. Parte 3: Protocolo para la verificación en un único laboratorio de métodos de referencia y de métodos alternativos validados*.

www.une.org

ISO 17025. (2017). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*.

Ivashko, M., Burmei, S., Yusko, L., Chaikovska, T., & Boyko, N. (2023). Microbiological diagnostics: From traditional to molecular genetic methods: A literature review. *Bulletin Of Medical And Biological Research*, 5(4), 34–41.

<https://doi.org/10.61751/BMBR/4.2023.34>

- Kengne, M. F., Mbaveng, A. T., & Kuete, V. (2024). Antibiotic Resistance Profile of *Staphylococcus aureus* in Cancer Patients at Laquintinie Hospital in Douala, Littoral Region, Cameroon. *BioMed Research International*, 2024(1), 5859068.
<https://doi.org/10.1155/2024/5859068>
- Liu, F., Lee, S. A., Xue, J., Riordan, S. M., & Zhang, L. (2022). Global epidemiology of campylobacteriosis and the impact of COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 979055. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.979055/XML>
- Lopez, M. (2020). Repetibilidad y Reproducibilidad en las Mediciones del Espesor de Tubos de Acero para Ferroaducto. *Conciencia Tecnológica*, 59.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?>
- Martino Zagovalov, T. K., Leyva Castillo, V., Ramón Corría, M., Puig Peña, Y., Ferrer Márquez, Y., Martino Zagovalov, T. K., Leyva Castillo, V., Ramón Corría, M., Puig Peña, Y., & Ferrer Márquez, Y. (2023). PROCEDIMIENTO PARA LA VERIFICACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CUALITATIVOS DE REFERENCIA DE LA CADENA ALIMENTARIA. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 54, 248–259.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24502023000100248&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Meizheng BIO- TECH. (2022). *Prueba de microbiología Placa de recuento microbiano*.
www.onlinedoctranslator.com
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (n.d.). *Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA)*. Retrieved September 3, 2025, from
https://www.salud.gob.ec/arcsa/?utm_source=chatgpt.com
- Moossavi, S., Fehr, K., Khafipour, E., & Azad, M. B. (2021). Repeatability and reproducibility assessment in a large-scale population-based microbiota study: case

study on human milk microbiota. *Microbiome*, 9(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1186/S40168-020-00998-4/FIGURES/3>

Munno, K., Lusher, A. L., Minor, E. C., Gray, A., Ho, K., Hankett, J., T Lee, C. F., Primpke, S., McNeish, R. E., Wong, C. S., & Rochman, C. (2023). Patterns of microparticles in blank samples: A study to inform best practices for microplastic analysis. *Chemosphere*, 333, 138883. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.138883>

OMS. (2024). *Inocuidad de los alimentos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

Organización Internacional de Normalización. (2024). *ISO - Normas*. <https://www.iso.org/es/normas>

Organización Mundial de la Salud. (2015). *Estimating the burden of foodborne diseases*. <https://www.who.int/activities/estimating-the-burden-of-foodborne-diseases>

Paswan, R., & Park, Y. W. (2020). Survivability of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 Pathogens and Food Safety Concerns on Commercial Powder Milk Products. *Dairy 2020, Vol. 1, Pages 189-201, 1(3)*, 189–201. <https://doi.org/10.3390/DAIRY1030014>

Pérez-Boto, D., D'Arrigo, M., García-Lafuente, A., Bravo, D., Pérez-Baltar, A., Gaya, P., Medina, M., & Arqués, J. L. (2023). Staphylococcus aureus in the Processing Environment of Cured Meat Products. *Foods*, 12(11), 2161. <https://doi.org/10.3390/FOODS12112161/S1>

Popa, E. E., Ungureanu, E. L., Geicu-Cristea, M., Mitelut, A. C., Draghici, M. C., Popescu, P. A., & Popa, M. E. (2023). Trends in Food Pathogens Risk Attenuation. *Microorganisms* 2023, Vol. 11, Page 2023, 11(8), 2023. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11082023>

- Quintela, I. A., Vasse, T., Lin, C.-S., Wu, V. C. H., Banerjee, P., Forstinus Nwabor, O., & Gov, V. W. (2022). Advances, applications, and limitations of portable and rapid detection technologies for routinely encountered foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1054782. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.1054782>
- Ripolles-Avila, C., Martínez-Garcia, M., Capellas, M., Yuste, J., Fung, D. Y. C., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2020). From hazard analysis to risk control using rapid methods in microbiology: A practical approach for the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(4), 1877–1907. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12592>;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION
- Schloss, P. D. (2018). Identifying and Overcoming Threats to Reproducibility, Replicability, Robustness, and Generalizability in Microbiome Research. *MBio*, *9*(3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00525-18>
- Singh, R., & Puniya, A. K. (2024). Role of Food Safety Regulations in Protecting Public Health. *Indian Journal of Microbiology*, *64*(3), 1376–1378. <https://doi.org/10.1007/s12088-024-01240-7>
- Taiwo, O. R., Onyeaka, H., Oladipo, E. K., Oloke, J. K., & Chukwugozie, D. C. (2024). Advancements in Predictive Microbiology: Integrating New Technologies for Efficient Food Safety Models. *International Journal of Microbiology*, *2024*(1), 6612162. <https://doi.org/10.1155/2024/6612162>
- Tasanapak, K., Kucharoenphaibul, S., Wongwigkarn, J., Sitthisak, S., Thummeepak, R., Chaibenjawong, P., Chatdumrong, W., & Nimanussornkul, K. (2023). Prevalence and virulence genes of *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in Thai restaurants. *PeerJ*, *11*, e15824. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.15824/SUPP-2>
- Wang, X., Wang, L., Wei, X., Xu, C., Cavender, G., Lin, W., & Sun, S. (2025). *Invited review: Advances in yogurt development*—Microbiological safety, quality,

functionality, sensory evaluation, and consumer perceptions across different dairy and plant-based alternative sources. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25322>

Zhu, Z., Wu, S., Chen, X., Tan, W., Zou, G., Huang, Q., Meng, X., Hu, D.-L., & Li, S. (2023).

Heterogeneity and transmission of food safety-related enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in pig abattoirs in Hubei, China . *Microbiology Spectrum*, *11*(5).

https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.01913-23/SUPPL_FILE/SPECTRUM.01913-23-S0001.PDF

Apéndice A. Materiales, equipos y condiciones ambientales

Tabla 12*Equipos utilizados en el ensayo*

Equipo	Capacidad	Código	Fecha de calibración / caracterización
Micropipetas	100-1000 ul	AGRO-INST-014	2024/08/15
Micropipetas	200-1000 ul	AGRO-INST-016	2024/08/15
Cabina de flujo laminar	-	AGRO-INST-024	2024/08/15
Cabina de flujo laminar	-	AGRO-INST-082	2024/08/15
Stomacher		AGRO-INST-029	2024/08/15
Incubadora	36 ± 1°C	AGRO-INST-056	2024/08/15
Autoclave	-	AGRO-INST-019	2024/08/17
Refrigeradora	-	AGRO-INST-006	-
Congelador	-	AGRO-INST-036	-
Vortex	-	AGRO-INST-011	2024/08/15
Balanza	3000 g	AGRO-INST-025	2024/08/15
Balanza	3000 g	AGRO-INST-026	2024/08/15

Tabla 13*Materiales utilizados en el ensayo*

Materiales
Placas MicroFast <i>Staphylococcus aureus</i>
Puntas 1.0 mL estériles.
Fundas estériles.
Tubos de ensayos tapa rosca 15 mL
Frascos volumétricos con tapa

Tabla 14

Condiciones de laboratorio al realizar el ensayo

Factor	Medición
Humedad relativa	$\leq 60\%$
Temperatura	$20 \pm 5^{\circ}\text{C}$

Apéndice B. Cálculos de inoculación

Cálculos realizados para inocular las doce muestras de jamón

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde:

C_1 : concentración inicial de la solución (UFC/mL)

V_1 : volumen para contaminar muestras (mL)

C_2 : concentración deseada (UFC/mL)

V_2 : volumen total de la dilución (mL)

$$4.6 \times 10^4 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} (V)_1 = 100 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \times 500 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0.108 \text{ mL}$$

Cálculo de la carga deseada para los tres niveles de inoculación

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (\text{Ec. 6})$$

Nivel bajo

$$4 \times 10^3 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \times 1 \text{ mL} = C_2 \times 500 \text{ mL}$$

$$C_2 = 8 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

Con este resultado se espera obtener un conteo de 8 UFC en una dilución de 10^{-1}

Nivel medio

$$4 \times 10^5 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \times 1 \text{ mL} = C_2 \times 500 \text{ mL}$$

$$C_2 = 800 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

Con este resultado se espera obtener un conteo de 80 UFC en una dilución de 10^{-2}

Nivel alto

$$4 \times 10^7 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \times 1 \text{ mL} = C_2 \times 500 \text{ mL}$$

$$C_2 = 80000 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

Con este resultado se espera obtener un conteo de 80 UFC en una dilución de 10^{-4}

Apéndice C. Tabulación de datos primarios

Tabla 15

Datos primarios obtenidos al evaluar la carga natural de las muestras de jamón

Muestras	Dilución	Conteo (UFC)	Resultado (UFC/mL)
1	10	0	0
2	10	0	0
3	10	0	0
4	10	0	0
5	10	0	0
6	10	0	0
7	10	0	0
8	10	0	0
9	10	0	0
10	10	0	0
11	10	0	0
12	10	0	0

Tabla 16*Datos primarios obtenidos por el analista A de las muestras de jamón inoculadas*

ANALISTA A						
Muestras	Dilución	Conteo		Replica 2 UFC	Resultado UFC/mL	
		Replica 1 UFC	Dilución			
1	10	37	10	37	370	370
2	10	37	10	38	370	380
3	10	45	10	41	450	410
4	10	38	10	42	380	420
5	10	42	10	49	420	490
6	10	57	10	55	570	550
7	10	43	10	49	430	490
8	10	37	10	31	370	310
9	10	39	10	46	390	460
10	10	49	10	49	490	490
11	10	38	10	54	380	540
12	10	39	10	53	390	530

Tabla 17*Datos primarios obtenidos por el analista B de las muestras de jamón inoculadas*

ANALISTA B						
Conteo						
Muestras	Dilución	REPLICA 1 UFC	Dilución	RECPLICA 2 UFC	Resultado UFC/mL	
1	10	36	10	54	360	540
2	10	37	10	44	370	440
3	10	34	10	44	340	440
4	10	41	10	49	410	490
5	10	44	10	54	440	540
6	10	45	10	44	450	440
7	10	41	10	45	410	450
8	10	32	10	38	320	380
9	10	37	10	38	370	380
10	10	48	10	49	480	490
11	10	31	10	38	310	380
12	10	38	10	54	380	540

Tabla 18

Datos primarios de obtenidos al evaluar la carga natural de los diferentes alimentos

Conteo				
Muestras	Dilución	Replica 1 UFC	Dilución	Replica 2 UFC
1	10	0	10	0
2	10	0	10	0
3	10	0	10	0
4	10	0	10	0
5	10	0	10	0
6	10	0	10	0

Nota. Muestra 1= Yogurt; muestra 2 = Fruta confitada; muestra 3 = Jamón; muestra 4 =

Banano deshidratado; muestra 5= Pulpa de mango; muestra 6 = Atún crudo congelado

Tabla 19*Datos primarios de las muestras inoculadas*

Muestras	Nivel	Conteo				Resultado UFC/mL		Promedio del recuento final (experimental) UFC/g o mL
		Dilución	Replica 1	Dilución	Replica 2			
			UFC		UFC			
1	Bajo	10	9	10	9	90	90	90
2	Bajo	10	6	10	7	60	70	65
3	Medio	100	75	100	73	7500	7300	7400
4	Medio	100	72	100	74	7200	7400	7300
5	Alto	10000	64	10000	83	640000	83000	361500
6	Alto	10000	45	10000	68	450000	680000	565000

Nota. Muestra 1= Yogurt; muestra 2 = Fruta confitada; muestra 3 = Jamón; muestra 4 = Banano deshidratado; muestra 5= Pulpa de mango;

muestra 6 = Atún crudo congelado

Tabla 20

Datos primarios del inóculo + diluyente

Muestras	Nivel	CONTEO						Promedio del
		Dilución	Replica 1 UFC	Dilución	Replica 2 UFC	Resultado		Inóculo
						UFC/mL		(teórico)
								UFC/g o mL
1	Bajo	10	4	10	6	40	60	50
2	Bajo	10	3	10	2	30	20	25
3	Medio	100	66	100	64	6600	6400	6500
4	Medio	100	61	100	60	6100	6000	6050
5	Alto	10000	64	10000	67	640000	670000	655000
6	Alto	10000	65	10000	72	650000	720000	685000

Nota. Muestra 1= Yogurt; muestra 2 = Fruta confitada; muestra 3 = Jamón; muestra 4 = Banano deshidratado; muestra 5= Pulpa de mango; muestra 6 = Atún crudo congelad