

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS

PROYECTO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE QUÍMICA”

TEMA:

VALIDACIÓN DEL MÉTODO RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES
EN HARINA DE CAMARÓN USANDO PLACAS DE PETRIFILM

AUTOR:

JULISSA ELIZABETH MORETA ZAMBRANO

Guayaquil - Ecuador

2026

RESUMEN

La verificación de métodos microbiológicos es un requisito esencial para garantizar la confiabilidad de los resultados analíticos en laboratorios acreditados conforme a la norma ISO/IEC 17025. En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el desempeño del método AOAC 991.14 mediante placas Petrifilm™ para el recuento de coliformes totales en la matriz harina de camarón, un subproducto de origen marino con características fisicoquímicas complejas que pueden afectar la recuperación microbiana. El estudio se desarrolló bajo un diseño experimental intralaboratorial, siguiendo los lineamientos establecidos en la norma ISO 16140-3, y consideró la evaluación de las principales características de desempeño analítico: inclusividad, exclusividad, exactitud, precisión, límites de detección y cuantificación, así como la estimación de la incertidumbre de medición. Los resultados obtenidos evidenciaron que el método presenta un comportamiento analítico adecuado en la matriz estudiada, cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos para métodos cuantitativos en microbiología de alimentos. Asimismo, se observó una variabilidad controlada y una adecuada recuperación de coliformes totales bajo las condiciones específicas del laboratorio. En conclusión, el método AOAC 991.14 con placas Petrifilm™ es apto y confiable para su aplicación en el control microbiológico de harina de camarón, contribuyendo al aseguramiento de la calidad analítica y al cumplimiento de los requisitos normativos vigentes.

Palabras clave: coliformes totales, harina de camarón, Petrifilm™, AOAC 991.14, verificación de métodos.

ABSTRACT

Method verification is a fundamental requirement to ensure the reliability of analytical results in laboratories accredited to ISO/IEC 17025. In this context, this study aimed to evaluate the performance of the AOAC 991.14 method using Petrifilm™ plates for the enumeration of total coliforms in shrimp meal, a marine-derived matrix with complex physicochemical characteristics that may affect microbial recovery. The study was conducted under an intralaboratory experimental design, following the guidelines of ISO 16140-3, and assessed key analytical performance characteristics, including inclusivity, exclusivity, accuracy, precision, limits of detection and quantification, and measurement uncertainty. The results showed that the method exhibits suitable analytical performance in the studied matrix, fulfilling the acceptance criteria for quantitative microbiological methods in foods. Additionally, controlled variability and adequate recovery of total coliforms were observed under the specific laboratory conditions. In conclusion, the AOAC 991.14 method with Petrifilm™ plates is suitable and reliable for microbiological control of shrimp meal, contributing to analytical quality assurance and compliance with current regulatory requirements.

Keywords: total coliforms, shrimp meal, Petrifilm™, AOAC 991.14, method verification.

DEDICATORIA

A Dios y a la Santísima Virgen por guiar cada paso de este camino; a mi familia por ser mi inspiración y fortaleza constante; de manera especial a mis padres cuyo amor, ejemplo y enseñanzas perduran en mi vida.

AGRADECIMIENTO

Expreso mi profundo agradecimiento a los docentes y tutores, por su valiosa orientación, los conocimientos impartidos y el acompañamiento académico brindado durante el desarrollo de esta investigación, los cuales contribuyeron significativamente a mi formación profesional y científica.

Al laboratorio externo que proporcionó su apoyo técnico y las facilidades necesarias para la ejecución de los análisis, cuya colaboración fue fundamental para el cumplimiento de los objetivos planteados en el presente trabajo.

Este logro no solo representa la culminación de una etapa académica, sino también el reflejo del esfuerzo, la constancia y el compromiso con el rigor científico y la excelencia profesional, principios que orientarán mi ejercicio futuro.

Declaración Expresa

Yo Julissa Elizabeth Moreta Zambrano acuerdo y reconozco que: La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (**derechos de autor**) del proyecto de graduación corresponderá al autor, 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. El estudiante deberá procurar en cualquier caso de cesión de sus derechos patrimoniales incluir una cláusula en la cesión que proteja la vigencia de la licencia aquí concedida a la ESPOL.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, secreto empresarial, derechos patrimoniales de autor sobre 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 es 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, 23 de marzo del 2026.

Julissa Elizabeth Moreta Zambrano

Autor

EVALUADORES

Carmen Sofia Montiel Izquierdo, Mgtr
TUTOR

Cesar Augusto Araque Molina, PhD
EVALUADOR

Joel Eduardo Vielma Puente, PhD
PRESIDENTE

ABREVIATURAS O SIGLAS

- AOAC:** Association of Official Analytical Collaboration
- ISO:** International Organization for Standardization
- FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura
- WHO:** Organización Mundial de la Salud
- LOD:** Límite de detección
- LOQ:** Límite de Cuantificación
- HACCP:** Hazard Analysis and Critical Control Points
- UE:** Unión Europea
- FDA:** Food and Drug Administration
- ARCSA:** Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia
- MAGP:** Ministerio de Agricultura, ganadería y pesca
- ICMSF:** International Commission on Microbiological Specifications for Foods
- BPM:** Buenas Prácticas de Manufactura
- VRBA:** Violet Red Bile Agar
- EMB:** Eosin Methylene Blue
- MPN:** Número más Probable
- UFC/g:** Unidades formadoras de colonias sobre gramos
- SIR:** Desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio
- eBias:** Desviación estimada
- EA:** Ensayo de aptitud
- u_c:** Incertidumbre combinada
- u_{téc}:** Incertidumbre técnica
- u_{matriz}:** Incertidumbre de la matriz
- u_{distrib}:** Incertidumbre de distribución
- u_{Poisson}:** Incertidumbre de Poisson
- k:** Factor de cobertura
- U:** Incertidumbre expandida
- BHI:** Brain Heart Infusion
- TSA:** Trypticase Soy Agar

S: desviación estándar

\bar{X} : promedio

log₁₀: Logaritmo base 10

%Rec: porcentaje de recuperación

%CV: porcentaje de covarianza

ANOVA: Analysis of Variance

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|-------------|
| ABREVIATURAS O SIGLAS..... | VIII |
| LISTADO DE FIGURAS..... | XIII |
| LISTADO DE TABLAS..... | XV |
| CAPÍTULO 1..... | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Antecedentes..... | 2 |
| 1.2. Descripción del problema..... | 3 |
| 1.3. Objetivos..... | 4 |
| 1.3.1 Objetivo General..... | 4 |
| 1.3.2 Objetivos Específicos..... | 4 |
| 1.4. Hipótesis..... | 5 |
| 1.5. Alcance..... | 5 |
| CAPÍTULO 2..... | 6 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 6 |
| 2.1 Inocuidad y control microbiológico en alimentos..... | 6 |
| 2.1.1 Importancia del control microbiológico..... | 6 |
| 2.1.2 Microorganismos indicadores en alimentos..... | 6 |
| 2.1.3 Regulaciones y estándares microbiológicos..... | 7 |
| 2.1.4 Importancia en laboratorios acreditados..... | 7 |
| 2.1.5 Normas y organismos de referencia..... | 8 |
| 2.2 Coliformes totales como indicadores microbiológicos..... | 10 |
| 2.2.1 Definición y clasificación..... | 10 |
| 2.2.2 Relevancia en la evaluación de calidad..... | 10 |
| 2.3 Características microbiológicas de la harina de camarón..... | 11 |
| 2.3.1 Descripción de la matriz..... | 11 |
| 2.3.2 Riesgos microbiológicos asociados..... | 12 |
| 2.3.3 Control de calidad en matrices proteicas complejas..... | 13 |
| 2.4 Métodos microbiológicos para el recuento de coliformes..... | 13 |
| 2.4.1 Métodos tradicionales de cultivo..... | 13 |
| 2.4.2 Métodos rápidos o alternativos..... | 14 |
| 2.4.3 Principio del método Petrifilm™ AOAC 991.14..... | 15 |
| 2.5 Aplicaciones del método AOAC 991.14..... | 17 |
| 2.5.1 Estudios previos en matrices alimentarias..... | 17 |

| | | |
|------------------------|---|----|
| 2.5.2 | Adaptación a nuevas matrices | 17 |
| 2.6 | Validación y/o verificación de métodos de recuento de coliformes..... | 18 |
| 2.6.1 | Conceptos básicos | 18 |
| 2.6.2 | Objetivo de validación y/o verificación. | 19 |
| 2.6.3 | Proceso de validación..... | 19 |
| 2.6.4 | Características de desempeño analítico | 20 |
| 2.6.4.1 | Inclusividad y exclusividad..... | 20 |
| 2.6.4.2 | Veracidad (sesgo) | 21 |
| 2.6.4.3 | Precisión..... | 21 |
| 2.6.4.4 | Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)..... | 21 |
| 2.6.4.5 | Incertidumbre Combinada y Expandida | 22 |
| 2.6.5 | Relevancia de la verificación en este estudio..... | 27 |
| CAPÍTULO 3..... | 29 | |
| 3. | METODOLOGÍA..... | 29 |
| 3.1.1 | Tipo de investigación | 29 |
| 3.1.2 | Diseño de investigación | 29 |
| 3.2 | Metodología | 29 |
| 3.2.1 | Variables..... | 29 |
| 3.2.2 | Diseño experimental | 30 |
| 3.2.3 | Recolección de datos..... | 32 |
| 3.2.3.1 | Métodos y técnicas..... | 32 |
| 3.2.3.1.1 | Procedimiento detallado de recolección de datos:..... | 32 |
| 3.2.3.1.2 | Estructura de los ensayos de la validación | 36 |
| 3.2.3.2 | Recursos | 53 |
| 3.2.4.1 | Métodos de análisis..... | 55 |
| 3.2.4.2 | Justificación del análisis | 57 |
| 3.2.4.3 | Validación de resultados..... | 57 |
| CAPÍTULO 4..... | 59 | |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 59 |
| 4.1 | Protocolo de validación (características de desempeño)..... | 59 |
| 4.2 | Evaluación del desempeño del método Petrifilm en harina de camarón..... | 60 |
| 4.2.1 | Inclusividad y exclusividad..... | 61 |
| 4.2.2 | Precisión..... | 64 |
| 4.2.3 | Exactitud..... | 69 |
| 4.2.4 | Incertidumbre de medición..... | 72 |
| 4.3 | Evaluación del LOD y LOQ en la matriz de estudio..... | 77 |

| | | |
|------------------------|---|------------|
| 4.3.1 | Límite de Detección (LOD)..... | 77 |
| 4.3.2 | Límite de Cuantificación (LOQ)..... | 79 |
| 4.4 | Evaluación integral del método AOAC 991.14..... | 80 |
| CAPÍTULO 5..... | | 84 |
| 5. | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 84 |
| 6. | REFERENCIAS..... | 878 |
| 7. | APÉNDICES Y ANEXOS..... | 92 |
| | ANEXO A: Tipos de toma de muestra colectivas..... | 92 |
| | ANEXO B: Tabla de referencia para determinar objetivos o criterios de validación..... | 93 |
| | ANEXOS C: Protocolo para analizar la incertidumbre de medición..... | 94 |
| | ANEXO D: Protocolo de validación..... | 96 |
| | APÉNDICE A: Características de desempeño..... | 113 |

LISTADO DE FIGURAS

| | |
|--|------------|
| Figura 2.1. Principales fuentes de incertidumbre asociadas a la microbiología de la cadena alimentaria consideradas en este documento | 24 |
| Figura 2.2. Tabla de Valores de U_{Poisson} para valores ΣC comprendidos entre 1 y 40 | 26 |
| Figura 3.1. Lectura de colonias coliformes en placa petrifilm CC..... | 34 |
| Figura 3.2. Diagrama de flujo del proceso. | 35 |
| Figura 3.3 Test de turbidez..... | 37 |
| Figura 3. 4 Dilución de la concentración inicial de la cepa de trabajo. | 37 |
| Figura 3. 5. Procedimientos para obtener muestras colectivas y combinadas. | 38 |
| Figura 3.6 Ejemplo de una determinación preliminar del nivel de inóculo. | 40 |
| Figura 3. 7 Ejemplo de preparación de inóculo. | 40 |
| Figura 3. 8 Ejemplo de Inoculación de las porciones de análisis. | 41 |
| Figura 3. 9 Ejemplo de verificación del método cuantitativo (eBias) utilizando contaminación artificial. | 42 |
| Figura 3. 10 Protocolo de estudio para estimar la desviación estándar de la reproducibilidad. | 44 |
| Figura 3. 11 Diagrama de espina de pescado de los componentes de incertidumbre del método. | 47 |
| Figura 3. 12 Valores de u Poisson para valores ΣC comprendidos entre 1 y 40. | 51 |
| Figura 4.1. Resultados de verificación de contaminación de muestra seleccionadas .. | 61 |
| Figura 4.2. Resultados <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Escherichia coli</i> en placas Petrifilm CC. | 62 |
| Figura 4.3. Resultados <i>Escherichia coli</i> en placas Petrifilm CC. | 62 |
| Figura 4.4. Resultados de cepas no objetivos de estudio en placas Petrifilm CC. | 63 |
| Figura 4.5. Siembra de la concentración del inóculo $1,5 \times 10^8$ UFC/ml | 66 |
| Figura 4.6. Fotos de siembra | 66 |
| Figura 4.7. Siembra de la concentración del inóculo $1,8 \times 10^8$ UFC/ml | 70 |
| Figura 4.8. Resultado de siembra del inóculo. | 70 |
| Figura 4.9. Resultado de siembra de muestra más inóculo. | 71 |
| Figura 4.10. Resultado de siembra de porción A | 73 |
| Figura 4.11. Resultado de siembra de porción B | 73 |
| Figura 4.12. Resultado de siembra de porción A para U_{matriz} | 756 |
| Figura 4.13. Resultado de siembra de porción B. para U_{matriz} | 756 |
| Figura 4.14. Resultado de siembra incertidumbre de poisson. | 77 |
| Figura 4.15. Resultado de siembra de muestra en los 2 niveles y blanco..... | 80 |
| Figura 7.1. Procedimientos para obtener muestras colectivas y combinadas. | 92 |
| Figura 7 2. Reporte de resultados interlaboratorio de método AOAC 991.14 en diferentes matrices. | 93 |
| Figura 7.3. Protocolo para analizar exactamente dos porciones de ensayos de todas las muestras de laboratorio..... | 94 |
| Figura 7.4. Diseño experimental para estimar la incertidumbre de la matriz a partir de un mínimo de dos porciones de ensayo de cada muestra de laboratorio. Diseño para cada muestra de laboratorio. | 95 |
| Figura 7.5. Fotos de siembra de verificación de contaminación de muestra seleccionadas. | 113 |

| | |
|--|--------------|
| Figura 7.6. Fotos de siembra de la evaluación de la inclusividad. | 114 |
| Figura 7.7. Fotos de siembra de la evaluación de la exclusividad..... | 114 |
| Figura 7.8. Fotos de siembra del inóculo inicial $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. | 115 |
| Figura 7.9. Fotos de siembra para evaluación de la desviación estándar intralaboratorio. | 115 |
| Figura 7.10. Fotos de siembra del inóculo inicial $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. | 128 |
| Figura 7.11. Fotos de siembra de evaluación de eBIAS. | 127 |
| Figura 7.12. Fotos de siembra de muestra + inóculo evaluación de eBIAS. | 128 |
| Figura 7.13. Fotos de siembra para cálculo de incertidumbre técnica porción A.... | 12930 |
| Figura 7.14. Fotos de siembra para cálculo de incertidumbre técnica porción B.... | 12930 |
| Figura 7.15. Fotos de siembra para cálculo de incertidumbre matriz | 130 |
| Figura 7.16. Fotos de siembra para determinar límite de detección..... | 131 |

LISTADO DE TABLAS

| | |
|--|------------|
| Tabla 2.1 Selección de categorías de objeto de estudio. | 20 |
| Tabla 3.1. Cepas objetivas de estudio para estudio de inclusividad..... | 40 |
| Tabla 3.2. Cepas no objetivas de estudio para la exclusividad. | 40 |
| Tabla 3.3. Concentración de los inóculos con y sin muestra más el diluyente. | 42 |
| Tabla 3.4. Niveles de contaminación, dilución e inóculo. | 48 |
| Tabla 3.5. Variaciones experimentales de la porción A y B..... | 49 |
| Tabla 3.6. Condiciones de repetibilidad. | 51 |
| Tabla 3.7. Aceptación de todas las características de desempeño. | 57 |
| | |
| Tabla 4.1. Reporte de resultados obtenido de evaluación de muestras seleccionadas para estudio. | 60 |
| Tabla 4 2. Reporte de resultados obtenido de cepas objetivas sembradas en placa petrifilm. | 61 |
| Tabla 4.3. Reporte de resultados obtenido de cepas no objetivas sembradas en placa petrifilm CC. | 63 |
| Tabla 4 4. Comparación de resultados de inclusividad y exclusividad con otros estudios. | 64 |
| Tabla 4.5. Calculo de la desviación estándar intralaboratorio (S_{IR}). | 65 |
| Tabla 4.6. Calculo para verificación de cumplimiento en la verificación de la implementación. | 65 |
| Tabla 4.7. Resultados del estudio interlaboratorio (SR) para Coliformes total y E.coli en placas de recuento de película seca. Referencia AOAC 991.14 (tabla 991.14)..... | 66 |
| Tabla 4.8. Resultados de diferencias significativas entre analistas de los niveles estudiados..... | 67 |
| Tabla 4.9. Comparación de resultados de % de CV, la desviación estándar intralaboratorio (S_{IR}) y precisión intermedia entre analistas..... | 68 |
| Tabla 4.10. Resultados de siembra en UFC/g para evaluación de eBIAS..... | 69 |
| Tabla 4.11. Resultados de siembra en log10 para evaluación de eBIAS. | 69 |
| Tabla 4.12. Resultados del estudio comparado con otros estudios | 72 |
| Tabla 4.13. Resultados de evaluación de la incertidumbre técnica (desviación estándar intralaboratorio | 73 |
| Tabla 4.14. Resultados de datos de siembra para incertidumbre matriz. | 74 |
| Tabla 4.15. Resultados de evaluación de la incertidumbre matriz..... | 75 |
| Tabla 4.16. Resultados de evaluación de la incertidumbre distribución (upoisson) | 76 |
| Tabla 4.17. Resultados de cálculo de incertidumbre combinada..... | 77 |
| Tabla 4.18. Resultados de cálculo de incertidumbre expandida..... | 77 |
| Tabla 4.19. Resultados de siembra de 2 niveles y blanco..... | 79 |
| Tabla 4.20. Comparación del resultado LOD y LOQ de estudio con otras matrices en estudio. | 81 |
| Tabla 4.21. Evaluación del cumplimiento de los objetivos de validación. | 823 |
| | |
| Tabla 7.1. Datos resultantes de la siembra del Nivel A para el estudio de precisión entre analistas..... | 115 |
| Tabla 7.2. Datos resultantes de la siembra del Nivel B para el estudio de precisión entre analistas..... | 116 |

| | |
|---|------------|
| Tabla 7.3. Datos resultantes de la siembra del Nivel C para el estudio de precisión entre analistas..... | 117 |
| Tabla 7.4. Resumen de resultados analíticos Nivel A de precisión entre analistas. ... | 118 |
| Tabla 7 5. Resumen de resultados analíticos Nivel B de precisión entre analistas. ... | 119 |
| Tabla 7.6. Resumen de resultados analíticos Nivel C de precisión entre analistas. ... | 120 |
| Tabla 7.7. Cálculo de los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos del nivel A (Análisis de Varianza). | 121 |
| Tabla 7 8. Cálculo del %RSDIR =%CV los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos del nivel A (Análisis de Varianza). | 122 |
| Tabla 7 9. Nivel A (Análisis de Varianza por solo factor Excel). Evaluación de diferencias significativas entre analista..... | 122 |
| Tabla 7.10. Cálculo de los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos del nivel B (Análisis de Varianza) | 123 |
| Tabla 7 11. Cálculo del %RSDIR =%CV los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos del nivel B (Análisis de Varianza). | 124 |
| Tabla 7.12. Nivel B (Análisis de Varianza por solo factor Excel). Evaluación de diferencias significativas entre analistas. | 124 |
| Tabla 7.13. Cálculo de los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos del nivel C (Análisis de Varianza). | 125 |
| Tabla 7.14. Cálculo del %RSDIR =%CV los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos del nivel C (Análisis de Varianza) | 126 |
| Tabla 7.15. Nivel C (Análisis de Varianza por solo factor Excel). Evaluación de diferencias significativas entre analistas..... | 126 |

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El aseguramiento de resultados confiables y reproducibles en el análisis microbiológico, particularmente en el recuento de coliformes totales, constituye un aspecto esencial dentro de los sistemas de calidad de los laboratorios de ensayo. En este contexto, la validación y verificación de métodos se han consolidado como requisitos fundamentales establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017, orientados a demostrar la competencia técnica y la confiabilidad de los resultados analíticos. Paralelamente, el análisis microbiológico de alimentos ha evolucionado de manera significativa, impulsando el desarrollo de métodos alternativos validados que permiten optimizar tiempos de análisis y recursos, sin comprometer la calidad del dato, siempre que su desempeño sea demostrado conforme a estándares internacionales.

Dentro de estos avances, las placas Petrifilm™ se han posicionado como una herramienta eficaz para el recuento de microorganismos indicadores, como los coliformes totales, en diversas matrices alimentarias. El método AOAC 991.14, validado por organismos internacionales, ha demostrado precisión y eficiencia operativa en alimentos líquidos, semisólidos y sólidos. No obstante, la mayor parte de los estudios disponibles se han centrado en matrices tradicionales, como productos lácteos, cárnicos o vegetales, existiendo una limitada evidencia científica sobre su aplicación específica en matrices complejas de origen marino, como la harina de camarón, cuya composición fisicoquímica puede afectar la recuperación microbiana.

La harina de camarón representa un desafío analítico debido a su alto contenido proteico y de materia orgánica, lo que puede interferir en el desempeño de los métodos microbiológicos convencionales. Ante esta problemática, resulta necesario verificar la aplicabilidad del método AOAC 991.14 mediante placas Petrifilm™ en esta matriz específica, conforme a los lineamientos establecidos por la norma ISO 16140-3. La presente investigación se orienta a evaluar el desempeño analítico del método en harina de camarón, con el fin de demostrar su idoneidad, confiabilidad y cumplimiento de los requisitos técnicos y normativos, contribuyendo así al fortalecimiento del control microbiológico y a la generación de evidencia técnica en una matriz poco estudiada.

1.1. Antecedentes

El aseguramiento de los resultados confiables y reproducibles en análisis de recuento de coliformes totales son productos de un proceso de validación. En una gran parte del mundo, se han convertido en un requisito de cumplimiento de la norma 17025, como exigencia en los laboratorios de ensayos microbiológicos (Eurachem, 2023; International Organization for Standardization, 2017).

El análisis microbiológico de alimentos ha evolucionado considerablemente en las últimas décadas, impulsado por la necesidad de contar con métodos rápidos, confiables y adaptables a diversas matrices. Uno de los enfoques más relevantes ha sido el desarrollo e implementación de métodos alternativos validados, que permiten sustituir técnicas tradicionales sin comprometer la calidad del dato analítico (ISO, 2024; Silva & Gibbs, 2021).

Dentro de estos avances, las placas Petrifilm se han posicionado como una alternativa eficaz para el recuento de microorganismos, como los coliformes totales, en diversos alimentos. Originalmente desarrolladas por 3M, estas placas han sido validadas por organismos internacionales como la AOAC International, siendo el método AOAC 991.14 (Latimer, 2016) uno de los referentes normativos más reconocidos para el análisis microbiológico de coliformes mediante placas rehidratables en alimentos sólidos y líquidos (Curiale, 1991; Jasson et al., 2010).

Numerosos estudios han demostrado que esta técnica es un método preciso y robusto para el conteo de coliformes (Schumacher et al., 2022), (Le et al., 2022). Además, el sistema puede proporcionar una ruta alternativa para detectar contaminación bacteriana que permite identificar y solucionar problemas con mayor rapidez (Anderson et al., 2024). Sin embargo, gran parte de la literatura científica se ha centrado en matrices acuosas o semisólidas (lácteos, cárnicos, vegetales, alimentos procesados), y existe una limitada cantidad de investigaciones dirigidas específicamente a matrices de harina de camarón (Salmerón & Gutiérrez, 2021).

En este contexto, la ISO 16140 (ISO, 2022) se convierte en una norma clave, ya que establece los criterios técnicos y estadísticos que deben cumplirse para validar métodos microbiológicos alternativos, asegurando su equivalencia con el método de referencia en cada matriz específica. La norma considera aspectos como exactitud, precisión, límite de detección y selectividad, siendo ampliamente utilizada para la aceptación de métodos rápidos en laboratorios acreditados.

Por tanto, la presente investigación busca contribuir al conocimiento técnico y normativo en el área de validación de métodos, mediante la aplicación del método AOAC 991.14 (Latimer, 2016) con placas Petrifilm para el recuento de coliformes totales en harina de camarón, conforme a los requisitos de la norma ISO 16140 (ISO, 2022), evaluando su aplicabilidad, desempeño analítico y confiabilidad en una matriz compleja y poco estudiada hasta ahora (Huss, 2019).

1.2. Descripción del problema

El control microbiológico en alimentos es una actividad crítica para garantizar la inocuidad y calidad sanitaria de los productos que llegan al consumidor, tal como establecen los organismos reguladores internacionales (FAO/WHO, 2020; ISO-7218, 2024). Entre los indicadores microbiológicos más utilizados se encuentran los coliformes totales, cuya presencia en un alimento señala posibles fallas en las condiciones higiénico-sanitarias del proceso productivo (Jay et al., 2005; Silva & Gibbs, 2021). Por esta razón, su monitoreo es exigido en numerosas regulaciones y estándares internacionales (Codex Alimentarius Commission, 2024).

La industria de procesamiento de harina de camarón enfrenta desafíos analíticos importantes al momento de evaluar la carga microbiana. Esta matriz con alto contenido proteico y materia orgánica puede interferir en el desempeño de métodos microbiológicos tradicionales, ya que altera la recuperación y multiplicación de los microorganismos durante el cultivo (Huss, 2019; Salmerón & Gutiérrez, 2021). Por tanto, el análisis microbiológico en este tipo de producto requiere métodos adaptados o validados específicamente (Eurachem, 2023; ISO, 2016).

Ciertamente, el método AOAC 991.14, que valida el uso de placas Petrifilm para el recuento de coliformes en alimentos, ha sido ampliamente aceptado para diversas matrices alimentarias como lácteos, cárnicos y vegetales (Curiale, 1991; Latimer, 2016; Jasson et al., 2010). Sin embargo, no existe suficiente evidencia sobre su desempeño específico para demostrar la idoneidad en matrices distintas como la harina de camarón.

Ante esta situación, se hace necesario realizar un estudio de verificación del método AOAC 991.14 para el recuento de coliformes totales en una matriz no estudiada como harina de camarón, evaluando su desempeño analítico con respecto a la verificación de la implementación. Esta verificación permitirá demostrar que el laboratorio es capaz de realizar el método de forma correcta y capaz de analizar los alimentos que se encuentran dentro del alcance de aplicación del laboratorio; de manera que el método puede ser aplicado con confiabilidad en dicha matriz, cumpliendo con los requerimientos técnicos del laboratorio y con los estándares internacionales de calidad analítica (ISO, 2017)

En virtud de los desafíos analíticos que presenta la matriz de harina de camarón y de la limitada evidencia sobre la aplicación del método AOAC 991.14 en este tipo de producto, resulta necesario evaluar su desempeño bajo criterios técnicos y normativos reconocidos. En este contexto, se plantea la siguiente interrogante de investigación: ¿Cómo puede verificarse el método AOAC 991.14 para el recuento de coliformes totales mediante placas Petrifilm™ en harina de camarón, de manera que cumpla con los criterios de desempeño analítico establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 y la ISO 16140-3, garantizando resultados confiables, precisos y reproducibles para su aplicación en el control microbiológico de esta matriz?

1.3. Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar el método AOAC 991.14 para el recuento de coliformes totales en harina de camarón mediante la técnica de placas Petrifilm, garantizando el cumplimiento de los objetivos de validación,

1.3.2 Objetivos Específicos

- Diseñar un protocolo de validación, estableciendo las características de desempeño con sus respectivos objetivos de calidad.
- Evaluar la inclusividad, exclusividad, precisión, exactitud e incertidumbre del método con placas Petrifilm en la matriz de harina de camarón; mediante herramientas estadísticas.

- Determinar los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método validado en la matriz; mediante ensayos analíticos.
- Determinar la validez de la metodología AOAC 991.14 para el recuento de coliformes totales en harina de camarón.

1.4. Hipótesis

El método AOAC 991.14 basado en placas Petrifilm es adecuado para el recuento de coliformes totales en harina de camarón y cumple con los parámetros de desempeño analítico (exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, inclusividad, exclusividad e incertidumbre) establecidos por la norma ISO 16140-3:2021, cuando se aplica bajo las condiciones específicas del laboratorio usuario.

1.5. Alcance

El presente estudio tiene como alcance la verificación del desempeño del método AOAC 991.14, basado en el uso de placas Petrifilm para el recuento de coliformes totales, cuando se aplica a la matriz harina de camarón. La verificación se realizará conforme a los lineamientos de la norma ISO 16140-3:2021 en métodos cuantitativos, que establece los procedimientos que debe seguir el laboratorio para confirmar que un método alternativo validado es apto para su uso en condiciones específicas.

La verificación se llevará a cabo en un laboratorio de microbiología de control animal, bajo condiciones controladas, utilizando harina de camarón como única matriz y en un periodo de ejecución de 5 meses.

Este alcance no incluye la comparación del método con métodos de referencia ni la extensión de resultados a otras matrices o productos derivados del camarón. Tampoco se contempla la validación completa del método, sino únicamente su verificación para uso interno en el laboratorio bajo estudio.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Inocuidad y control microbiológico en alimentos

2.1.1 Importancia del control microbiológico

El control microbiológico en alimentos para la alimentación animal es un elemento fundamental para garantizar su inocuidad y proteger la salud de los animales, así como la de los consumidores finales de productos de origen animal. Este control permite detectar y cuantificar microorganismos indicadores, como coliformes totales y *Escherichia coli*, que reflejan la higiene del proceso, como patógenos específicos, tales como *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* (Jay et al., 2005; Silva & Gibbs, 2021), que representan riesgos directos para la salud.

El monitoreo sistemático a lo largo de la cadena de producción, desde las materias primas hasta el producto terminado, permite identificar desviaciones en procesamiento, almacenamiento y transporte, facilitando acciones preventivas antes de que los alimentos lleguen al consumo animal. Para este fin se integran sistemas de gestión de la inocuidad como HACCP y la acreditación ISO/IEC 17025, que garantizan trazabilidad y confiabilidad en los resultados analíticos. (ISO, 2017)

2.1.2 Microorganismos indicadores en alimentos

Los coliformes totales se emplean como indicadores internacionales porque su presencia señala contaminación fecal potencial o deficiencias en la higiene del proceso, aun cuando no todos sean patógenos (Jay et al., 2005). *E. coli*, se utiliza como indicador más específico de contaminación fecal reciente, mientras que el recuento de aerobios mesófilos permite estimar la carga microbiana total y evaluar la calidad general del alimento (Silva & Gibbs, 2021).

2.1.3 Regulaciones y estándares microbiológicos

Existen múltiples organismos y normas que establecen criterios y guías para el control microbiológico como:

- ✓ Codex Alimentarius: proporciona directrices sobre Buenas Prácticas de Alimentación Animal y los límites para ingredientes, como harinas de pescado, camarón, aceites, etc; que pueden contener contaminantes biológicos o químicos(Codex Alimentarius, 2024).
- ✓ FDA (EE. UU.) / UE (Unión Europea) / Autoridades Locales (ARCSA, MAGP): Estas entidades establecen los criterios de inocuidad para comercialización de subproductos animales utilizados en piensos que no destinados al consumo humano. Estas regulaciones definen los límites para patógenos en las materias primas, vitales para evitar brotes en la producción ganadera o acuícola.
- ✓ Los métodos de referencias de ensayos normalizados que han sido reconocidos por organismos como ISO(ISO, 2017; ISO, 2019; ISO, 2022), AOAC (Latimer, 2016) que proporcionan ensayos normalizados como por ejemplo detección de *Salmonella*, *E. coli*, Coliformes Totales que el laboratorio debe emplear para garantizar la validez de los resultados para los diferentes análisis en harina de pescado, camarón, el krill u otros insumos marinos cumplen con las especificaciones del cliente o la normativa legal.

2.1.4 Importancia en laboratorios acreditados

En los laboratorios acreditados, la verificación de métodos es un proceso fundamental para demostrar la competencia técnica y garantizar que los resultados generados cumplen con los requisitos establecidos por normas como ISO/IEC 17025. La verificación permite confirmar un método que previamente ha sido validado, ya sea un método de referencia, normado o uno provisto por el fabricante funciona correctamente bajo las condiciones específicas del laboratorio, considerando factores como infraestructura, equipamiento, analistas, reactivos y tipo de matriz (Eurachem, 2023).

A través de la verificación se comprueba que el método mantiene un desempeño adecuado en términos de precisión, exactitud, límites de detección, repetibilidad y

recuperación, lo cual asegura que los resultados son confiables y que el laboratorio puede aplicarlo de manera rutinaria sin comprometer su calidad. Este proceso es especialmente importante en matrices complejas como la harina de camarón, donde las características fisicoquímicas pueden afectar la recuperación microbiana si no se evalúa el método adecuadamente (Salmerón & Gutiérrez, 2021; Scharff & Farber, 2020).

Además, la verificación contribuye a garantizar que los resultados emitidos por el laboratorio sean trazables y reproducibles, dos elementos clave en el marco de la acreditación. La trazabilidad asegura que los resultados pueden vincularse con patrones reconocidos internacionalmente, mientras que la reproducibilidad evidencia que el método es consistente incluso cuando es ejecutado por diferentes analistas, en distintos momentos o bajo condiciones variables controladas (Eurachem, 2023; International Organization for Standardization, 2017).

En conjunto, la verificación de métodos fortalece la confianza del cliente, respalda la credibilidad del laboratorio ante organismos reguladores y constituye un pilar esencial para la toma de decisiones técnicas dentro de un sistema de gestión de calidad (ICMSF, 2018; Latimer, 2016).

2.1.5 Normas y organismos de referencia

Los procesos de verificación y validación de métodos microbiológicos en laboratorios acreditados se desarrollan dentro de un marco normativo sólido que garantiza la confiabilidad y aceptación internacional de los resultados. Entre las normas y organismos más relevantes se encuentran ISO 17025:2017, la ISO 16140 y los métodos oficiales AOAC, cada uno con un rol complementario en la evaluación del desempeño analítico (ISO, 2017; ISO, 2022).

La ISO/IEC 17025 establece los requisitos generales para la competencia técnica de los laboratorios de ensayo y calibración (ISO, 2017). Esta norma no solo exige la implementación de un sistema de gestión de calidad, sino que también enfatiza la necesidad de demostrar que los métodos utilizados son apropiados para su

propósito. En este sentido, ISO 17025 obliga al laboratorio a verificar el desempeño de los métodos bajo sus condiciones operacionales, asegurando que los resultados sean técnicamente válidos, trazables y reproducibles (Eurachem, 2023).

Por su parte, la ISO 16140-3 forma parte de la serie dedicada a la validación y verificación de métodos microbiológicos. Esta sección en particular se enfoca en la verificación de métodos alternativos por parte del laboratorio usuario. Su objetivo es confirmar que un método validado previamente ya sea por el fabricante o por organismos independientes es capaz de funcionar de manera equivalente en el laboratorio que pretende implementarlo, considerando su propia infraestructura, personal y matrices específicas, como la harina de camarón (Peris-Vicente et al., 2015; López-Campos & et al., 2019).

Los AOAC Official Methods, desarrollados y evaluados por la Association of Official Analytical Collaboration, representan un estándar internacional para la validación rigurosa de métodos analíticos. Los estudios AOAC incluyen ensayos colaborativos, evaluaciones de desempeño estadístico y comparaciones directas con métodos de referencia, lo que otorga a los métodos aprobados un alto nivel de reconocimiento mundial (Latimer, 2016). Esto es especialmente relevante para métodos rápidos o alternativos, como Petrifilm™ AOAC 991.14, cuya aceptación depende de este proceso de validación robusto (A. Schumacher et al., 2021).

La aplicación combinada de estas normas y organismos garantiza que el laboratorio utilice métodos que han sido validados internacionalmente, verificados localmente y soportados por un sistema de gestión competente, lo que asegura que los resultados generados sean técnicamente sólidos, comparables entre laboratorios y aceptados por autoridades regulatorias y clientes a nivel global (Eurachem, 2023; International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 2018; International Organization for Standardization, 2017). Este enfoque integrado fortalece la confiabilidad del laboratorio y respalda su capacidad para emitir resultados microbiológicos de alta calidad.

2.2 Coliformes totales como indicadores microbiológicos

2.2.1 Definición y clasificación

Los coliformes totales son un grupo heterogéneo de bacterias Gram-negativas capaces de fermentar lactosa como fuente de carbono con la producción de ácido y gas visible, cuando se incuban a 35°C a 37° C, durante 24 a 48 horas(Latimer, 2016). Pertenecen a la familia Enterobacteriácea o a otras familias similares, aunque la mayoría de los miembros de este grupo no causan enfermedades graves, su presencia en recuentos elevados es una señal de alerta.

La detección de coliformes totales se emplea principalmente como indicador de higiene y control de procesos en las matrices como harina de camarón ha estado expuesta a condiciones de contaminación o que ha habido un manejo incorrecto en las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) durante la recolección, el procesamiento térmico o el almacenamiento(Huss, 2019). Dentro de este grupo se distinguen los coliformes fecales como indicativo de contaminación fecal y *Escherichia coli* como especie de interés sanitario particular.

2.2.2 Relevancia en la evaluación de calidad

El recuento de coliformes totales ofrece una medida práctica y rápida para evaluar condiciones de fabricación y contaminación cruzada. Un aumento en coliformes puede indicar fallas en sanitización, contaminación ambiental o manipulación inadecuada (Jay et al., 2005). Sin embargo, la interpretación debe considerar posibles interferencias de la matriz en productos ricos en proteínas y lípidos (Salmerón & Gutiérrez, 2021) o enmascaramiento de colonias.

Aunque la presencia de coliformes totales no implica necesariamente la presencia de patógenos, su ocurrencia sostenida en productos o superficies revela deficiencias de control que pueden favorecer agentes patógenos. Por ello, los límites microbiológicos y los programas de monitoreo usan coliformes como parte de sistemas de verificación del control ambiental y de los procesos. Las decisiones correctivas suelen combinar recuentos indicadores con investigaciones adicionales en la cadena de proceso, pruebas de *E. coli* o patógenos específicos (FAO/WHO, 2020; Jay et al., 2005).

La producción de esta harina involucra procesos de cocción y secado que, si son efectivos, deberían eliminar prácticamente toda la flora bacteriana, incluidos los coliformes. Si la harina de camarón terminada presenta un recuento significativo de coliformes totales, es una evidencia directa de recontaminación o de un fallo grave en el proceso de secado. Un recuento inicial elevado sugiere una carga microbiana alta en la materia prima o un tratamiento térmico insuficiente (Huss, 2019; Pérez-Fernández & López-Gálvez, 2023).

Las posibles fuentes de la proliferación de coliformes pueden ser por contaminación cruzada desde superficies, cintas transportadoras, molinos o silos que no fueron limpiados y sanitizados adecuadamente. Otra fuente es el contacto con ambientes sucios, agua no tratada o personal que no sigue las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM). Finalmente, condiciones inadecuadas de almacenamiento o envasado pueden incrementar la carga microbiana (Codex Alimentarius, 2024; FAO/WHO, 2020; ICMS, 2018)

La interpretación de los resultados del recuento de coliformes en la harina de camarón solo es válida si se establece un marco regulatorio y metodológico riguroso, como son los límites máximos permisibles (M) y niveles aceptables (m) que se alineen con normativas internacionales (Codex Alimentarius, 2024) y requisitos del cliente (Codex Alimentarius Commission, 2024; ICMSF, 2018; ISO, 2017).

2.3 Características microbiológicas de la harina de camarón

2.3.1 Descripción de la matriz

La harina de camarón es un subproducto de la industria acuícola/pesquera elaborado a partir de los desechos o camarones enteros sometidos a procesos de cocción, secado y molienda. Su composición incluye proteínas de alto valor, lípidos, minerales y compuestos nitrogenados (Huss, 2019). Estas características

la convierten en un ingrediente valioso para la alimentación animal, pero también compleja desde el punto de vista analítico.

La heterogeneidad entre lotes (tamaño de partícula, contenido de humedad, contenido de grasa) y la posible presencia de sales y compuestos amínicos influyen en la supervivencia y recuperabilidad microbiana. Dado que la harina de camarón es un ingrediente no esterilizado destinado a la alimentación animal, los límites suelen ser menos estrictos que para consumo humano, pero deben ser suficientes para mitigar el riesgo de transmisión de patógenos entéricos como *Salmonella spp*, cuya posible presencia se correlaciona con la de coliformes termotolerantes (ICMSF, 2018).

2.3.2 Riesgos microbiológicos asociados

La naturaleza orgánica de la harina de camarón, junto con sus condiciones de procesamiento, puede favorecer la presencia de microorganismos si el secado no es eficiente o si existe manipulación inadecuada durante la molienda o el almacenamiento. Entre los principales riesgos se encuentran:

- Contaminación cruzada desde superficies, equipos o ambientes no higienizados.
- Humedad residual que facilita la proliferación microbiana.
- Oxidación de lípidos que puede afectar la estabilidad microbiológica.
- Supervivencia de microorganismos mesófilos tras procesos térmicos ineficientes (Salmerón & Gutiérrez, 2021).
- La matriz también tiende a formar grumos y puede presentar variabilidad en granulometría, lo cual influye en la homogenización de la muestra y, por ende, en la exactitud del recuento.

Estos factores justifican el uso de métodos validados específicamente para este tipo de matrices complejas. Por ello, es indispensable emplear métodos con parámetros de desempeño evaluados específicamente para matrices marinas deshidratadas, asegurando resultados confiables, reproducibles y trazables dentro del sistema de gestión del laboratorio. (Eurachem, 2023; ISO, 2022)

2.3.3 Control de calidad en matrices proteicas complejas

Las matrices ricas en proteicas y grasas, como la harina de camarón, presentan dificultades analíticas debido a la tendencia a formar agregados que atrapan microorganismos e interfieren en su recuperación (Huss, 2019). Además, ciertas proteínas pueden reaccionar con los componentes del medio de cultivo o alterar la disponibilidad de nutrientes, afectando la resuspensión y el crecimiento celular. Los lípidos pueden recubrir células y dificultar su contacto con el medio de cultivo, provocando interferencia en el recuento. La oxidación de lípidos, característica de harinas marinas almacenadas por periodos prolongados, puede liberar compuestos que inhiben el crecimiento de microorganismos sensibles (ICMSF, 2018; Jay et al., 2005; Kornacki & Gurtler, 2015; Salmerón & Gutiérrez, 2021; Silva & Gibbs, 2021).

Debido a estas interferencias, resulta indispensable aplicar protocolos de preparación y métodos microbiológicos validados específicamente para matrices proteico-grasas, ya que métodos estandarizados diseñados para alimentos simples suelen presentar desviaciones importantes en exactitud e incertidumbre. En el marco de un sistema de gestión del laboratorio, reconocer estas limitaciones permite establecer parámetros de desempeño realistas, seleccionar métodos con adecuada recuperación y garantizar resultados confiables para decisiones técnicas y regulatorias. Por ello, la selección de métodos microbiológicos debe considerar estas particularidades para asegurar precisión y exactitud (Eurachem, 2023; ISO, 2017; ISO, 2022; Latimer, 2016).

2.4 Métodos microbiológicos para el recuento de coliformes

2.4.1 Métodos tradicionales de cultivo

Los métodos convencionales incluyen recuentos en placas sobre medios selectivos como VRBA (Violet Red Bile Agar) o EMB (Eosin Methylene Blue), y métodos del Número más Probable (MPN) para líquidos o muestras con recuentos bajos. Las ventajas son su estandarización y amplia aceptación, pero presentan limitaciones: mayor tiempo de incubación (24–48 h), necesidad de manipulación extendida, y en matrices complejas se observan interferencias por el fondo de la muestra o crecimiento de microflora no objetivo (Curiale, 1991).

2.4.2 Métodos rápidos o alternativos

En los últimos años, el control microbiológico de alimentos y, particularmente, de matrices complejas como la harina de camarón, ha incorporado métodos rápidos o alternativos que permiten obtener resultados confiables en tiempos mucho menores que los métodos tradicionales de cultivo. Estos métodos han surgido como respuesta a la necesidad de laboratorios de análisis que requieren eficiencia operativa, reducción de tiempos de liberación de productos y mejoras en la trazabilidad del proceso analítico (Curiale, 1991, 2021; Velusamy et al., 2010).

Uno de los métodos más difundidos es el uso de placas Petrifilm™, las cuales integran en un solo dispositivo el medio de cultivo, gelificante y colorantes indicadores. Estas placas reducen significativamente la manipulación, ya que eliminan pasos como la preparación del agar, vertido en placas o esterilización de material. Además, requieren menos espacio en incubadoras y generan menos residuos plásticos, lo que contribuye a una operación más limpia y eficiente. En matrices proteicas como la harina de camarón, las Petrifilm™ han demostrado buena recuperación microbiana cuando la muestra se prepara adecuadamente y se valida el método para esta matriz específica. Numerosos estudios han demostrado que esta técnica es un método preciso y robusto para el conteo de coliformes (3M Company, 2020; Nelson et al., 2013; Latimer, 2016; Le et al., 2022; Scharff & Farber, 2020; Schumacher et al., 2021). Además, el sistema puede proporcionar una ruta alternativa para detectar contaminación bacteriana que permite identificar y solucionar problemas con mayor rapidez (Anderson et al., 2024).

Otro sistema ampliamente utilizado es Soleris®, una plataforma automatizada basada en detección óptica que monitorea cambios en la actividad microbiana en tiempo real. Este método permite detectar el crecimiento microbiano sin necesidad de observar colonias de manera visual, lo que acorta drásticamente los tiempos de obtención de resultados, especialmente en recuentos de microorganismos mesófilos, coliformes y levaduras. La automatización reduce la variabilidad entre analistas, mejora la reproducibilidad y minimiza los riesgos de contaminación

cruzada durante la manipulación (Neogen Corporation, 2022; Valderrama et al., 2016)

A estos sistemas se suman otras técnicas automatizadas, como detectores de impedancia, sistemas de fluorescencia, y equipos basados en mediciones de CO₂ o turbidez. Su ventaja principal es que requieren volúmenes pequeños de muestra, integran análisis en tiempo real y permiten seguimiento digital de resultados, lo cual es especialmente valioso dentro de un sistema de gestión de laboratorio que busca eficiencia, trazabilidad y reducción de errores humanos (Johnson et al., 2014).

En conjunto, los métodos rápidos o alternativos representan herramientas clave para laboratorios que trabajan con matrices complejas, ofreciendo rapidez, menor manipulación, reducción de residuos y mayor estandarización, siempre que se validen adecuadamente respecto a los métodos de referencia antes de su uso rutinario (Peris-Vicente et al., 2015; Eurachem, 2023; ISO, 2016; Latimer, 2016; Singh et al., 2018).

2.4.3 Principio del método Petrifilm™ AOAC 991.14

El método Petrifilm™ AOAC 991.14 se basa en el uso de placas listas para usar que integran todos los componentes necesarios para el crecimiento y detección de coliformes en un formato deshidratado y estandarizado. Cada placa contiene un medio de cultivo deshidratado, formulado específicamente para favorecer el desarrollo de bacterias coliformes, evitando la necesidad de preparar agar y reduciendo significativamente los tiempos de acondicionamiento del laboratorio (3M Company, 2020; Curiale, 1991).

Las placas incorporan un agente gelificante que se activa al adicionar la muestra diluida, permitiendo que el medio se distribuya de manera uniforme entre las láminas de la placa. Esta estructura facilita una difusión controlada de nutrientes, asegurando un crecimiento adecuado y una formación de colonias bien definidas. Además, incluyen un indicador de pH que reacciona ante las fermentaciones típicas de los coliformes, cambiando de color cuando se produce ácido durante el

metabolismo microbiano. Complementariamente, los reactivos cromogénicos permiten diferenciar visualmente a los coliformes de otros microorganismos, manifestándose en colonias características rodeadas de gas atrapado, lo que facilita la lectura e interpretación de resultados (Nelson et al., 2013; A. Schumacher et al., 2021; Valderrama et al., 2016).

El método AOAC 991.14 (Latimer, 2016) fue validado internacionalmente bajo los criterios de la Association of Official Analytical Collaboration (AOAC), lo que implica que el desempeño del método fue comparado rigurosamente con métodos de referencia tradicionales, tales como la siembra en agar violeta rojo bilis (VRBA). Esta validación incluyó estudios de precisión, exactitud, reproducibilidad interlaboratorio, recuperación y especificidad, demostrando que las placas Petrifilm™ ofrecen resultados equivalentes o superiores en diversas matrices alimentarias (Peris-Vicente et al., 2015; Latimer, 2016).

Entre las ventajas que presenta este método respecto a los métodos convencionales destacan su rapidez, la reducción de manipulaciones, el menor consumo de materiales y su alta estandarización, lo que disminuye la variabilidad entre analistas. Asimismo, las placas requieren menos espacio de incubación y generan menos residuos, lo que favorece una operación más eficiente dentro del laboratorio. Para matrices complejas como la harina de camarón, donde la manipulación excesiva de la muestra puede afectar la recuperación microbiana, el uso de Petrifilm™ representa una alternativa confiable siempre que se valide adecuadamente para esta matriz específica (Eurachem, 2023; ISO, 2022; Scharff & Farber, 2020).

Las placas Petrifilm™ consisten en dos capas: una base con gelificante y un recubrimiento con medios deshidratados e indicadores cromogénicos/enzimáticos que permiten la aparición de colonias coloreadas tras la incubación; se colocan sobre una lámina y se inocula el volumen definido de muestra o dilución. El método AOAC 991.14 describe el procedimiento operativo para recuento de coliformes totales con Petrifilm™, sus condiciones de incubación, criterios de lectura y factores de conversión (UFC/g). Entre sus ventajas destacadas están la reducción de espacio de incubación, la estandarización del sustrato y la facilidad de lectura

en matrices variadas; sin embargo, cuando se aplican a matrices fuera de su alcance de validación, se debe verificar su desempeño (sensibilidad, especificidad, precisión) (ISO, 2016; Neogen Corporation, 2022).

2.5 Aplicaciones del método AOAC 991.14

2.5.1 Estudios previos en matrices alimentarias

El método de la AOAC 991.14 y estudios asociados han documentado el uso de Petrifilm en matrices como lácteos, agua, y otros alimentos secos o hidratados, demostrando ventaja operativa respecto a agar sólido tradicional (Latimer, 2016). Numerosos estudios han demostrado que esta técnica es un método preciso y robusto para el conteo de coliformes, evidenciado por su buen desempeño en diversas matrices alimentarias (Anderson et al., 2024; Jasson et al., 2010). Además, el sistema puede proporcionar una ruta alternativa para detectar contaminación bacteriana, permitiendo identificar y solucionar problemas con mayor rapidez (Anderson et al., 2024).

Sin embargo, gran parte de la literatura científica se ha centrado en matrices acuosas o semisólidas (lácteos, cárnicos, vegetales, alimentos procesados), y existe una limitada cantidad de investigaciones dirigidas específicamente a matrices de harina de camarón (Pérez-Fernández & López-Gálvez, 2023; Salmerón & Gutiérrez, 2021).

En este contexto, la ISO 16140 se convierte en una norma clave, ya que establece los criterios técnicos y estadísticos que deben cumplirse para validar métodos microbiológicos alternativos, asegurando su equivalencia con el método de referencia en cada matriz específica (ISO, 2022; ISO.2016). La norma considera aspectos como exactitud, precisión, límite de detección, inclusividad, exclusividad e incertidumbre siendo ampliamente utilizada para la aceptación de métodos rápidos en laboratorios acreditados (Peris-Vicente et al., 2015; Eurachem, 2023).

2.5.2 Adaptación a nuevas matrices

La necesidad de verificar AOAC 991.14 en harina de camarón se justifica por factores que afectan la recuperación microbiana: alta carga de materia orgánica,

variabilidad en el contenido de humedad y grasa, interacción físico-química que complica la homogeneización y liberación de células bacterianas, además de la presencia potencial de inhibidores naturales propios de matrices de origen marino (Kornacki & Gurtler, 2015; Scharff & Farber, 2020).

La verificación permitirá establecer criterios operacionales claros como procedimientos de homogeneización, elección adecuada de diluyentes, rangos de lectura y criterios de aceptación para que el método funcione correctamente en esta matriz compleja y pueda ser utilizado de manera confiable sea aceptable en control de calidad del producto (Eurachem, 2023; ICMSF) 2018).

2.6 Validación y/o verificación de métodos de recuento de coliformes

2.6.1 Conceptos básicos

Validación: declaración de las características de rendimiento de un método y demostración objetiva de que este cumple con los requisitos de rendimiento para un uso previsto especificado(ISO, 2022)

Verificación: demostración de que un método validado implementado por un usuario tiene un rendimiento conforme a las especificaciones del método determinadas en el estudio que resultado adecuado para su uso provisto(ISO, 2022)

En microbiología existen dos tipos de verificación:

- Verificación de la implementación: es la demostración de que el laboratorio es capaz de llevar a cabo el método correctamente.
- Verificación del alimento (matriz): es la demostración que el laboratorio es capaz de analizar los alimentos que declara dentro de su alcance(ISO, 2022).

2.6.2 Objetivo de validación y/o verificación.

Los objetivos de la validación se definen desde la etapa de planificación y deben relacionarse directamente con las necesidades del usuario, los requisitos regulatorios, la normativa vigente y las exigencias del mercado. Además, estos objetivos tienen que corresponder con las características de desempeño establecidos para el método analítico y ajustarse en función del tipo de método y del nivel de concentración del analito que se desea evaluar.

2.6.3 Proceso de validación

El proceso de validación con la guía (Guide to Quality in Analytical Chemistry An Aid to Accreditation, 2016) desarrolla la secuencia organizada de las etapas:

- Necesidad analítica de los microorganismos de interés: definido por el jefe de laboratorio, debido algún requerimiento de los clientes o por cumplimiento de la matriz bajo alguna norma de control.
- Selección del Método: se realiza una revisión exhaustiva de los métodos disponibles para seleccionar el más apropiado; basado en el equipamiento que dispone el laboratorio.
- Análisis previo al procedimiento: Considerando los niveles de detección de los coliformes totales deseadas en el laboratorio, se elige el rango de trabajo adecuado.
- Puesta a punto del método: primero se debe chequear la calibración de equipos e instrumentos, utilizar cepas adecuadas y vigentes para validar la ejecución correcta del método. También se debe corregir procesos erróneos como errores en el uso de instrumentos, lecturas y preparaciones de cepas de trabajo y medios de cultivo. El personal designado para el proceso de estudio debe estar calificado y autorizado para la realización del ensayo.
- Características de desempeño de validación: Se determinan los parámetros críticos de control necesarios para una validación efectiva del método.

2.6.4 Características de desempeño analítico

2.6.4.1 Inclusividad y exclusividad

Definir estos parámetros como la capacidad del método para detectar el microorganismo objetivo sin interferencias producidas por la matriz o flora acompañante (Curiale, 1991; Jay et al., 2005).

La inclusividad corresponde a la capacidad del método para detectar un amplio rango de cepas pertenecientes al grupo objetivo, ver tabla 2.1; lo cual suele evaluarse con paneles de cepas de referencia (ISO, 2022; ISO, 2017).

La exclusividad por su parte es la capacidad para no detectar organismos no objetivo, evitando falsos positivos, ver tabla 2.1. Estos parámetros se evalúan mediante pruebas de laboratorio con paneles de cepas referencia y con material natural que contenga flora no objetivo (ISO, 2022; Latimer, 2016).

Tabla 2.1 Selección de categorías de objeto de estudio.

| Selección del grupo objetivo en un ensayo de inclusividad | Selección del grupo no objetivo en un ensayo de exclusividad |
|---|--|
| En grupos no definidos: definido por método de referencia | Definir grupos no objetos de estudios en función del grupo de objeto de estudio |
| En familias: cepas procedentes de un conjunto de géneros dentro de dicha familia | Cuando el grupo objeto de estudio es la familia: cepa no en estudio debe incluir otra familia relacionada de forma cercana |
| En los géneros: conjunto de especies dentro del mismo género. | Cuando el grupo objeto de estudio es un género: cepa no objeto de estudio debe incluir otro género considerando la bioquímica o genotípicamente similar al género objetivo |
| En las especies: conjunto de cepas dentro de cada especie | Cuando el grupo objeto de estudio es una especie: cepa de no objetivo debe incluir otra cepa perteneciente al género de estudio |
| En las cepas seo-específicas o fago-específicas: procedentes de serotipos y fagotipos | Cuando el grupo objeto de estudio es un serotipo fagotipos perteneciente a la misma especie: cepa de no objetivo debe incluir otra cepa de serotipos y fagotipos de la misma especie |

Fuente:

(ISO, 2016)

2.6.4.2 Veracidad (sesgo)

La veracidad o el sesgo de un método analítico se define como la diferencia sistemática entre el valor promedio obtenido a partir de las mediciones y el valor verdadero o aceptado como referencia. Este parámetro es fundamental en la validación de métodos analíticos, ya que permite asegurar la trazabilidad y confiabilidad de los resultados analíticos. Para su evaluación, se lo realizará mediante el análisis de alimentos contaminados artificialmente, los cuales fueron analizados por duplicado en tres niveles de contaminación. A partir de estos análisis, se determinó el sesgo como la diferencia absoluta entre los resultados obtenidos en las muestras de alimentos contaminados artificialmente y el valor medio de la suspensión del inóculo. El sesgo obtenido debía ser insignificante o, en su defecto, corregido adecuadamente (Eurachem, 2023).

La verificación del producto se evalúa mediante la desviación estimada; eBias; (bias medio en escala log₁₀) y se considera aceptable un sesgo dentro de límites preestablecidos $\pm 0.5 \log_{10}$ (ISO, 2022) para recuentos microbiológicos.

2.6.4.3 Precisión

La precisión incluye repetibilidad (misma condición operativa, corto intervalo) y reproducibilidad (entre laboratorios o entre días). Para verificación de la implementación de método se lo realiza mediante la desviación estándar intra laboratorio; la cual se calcula SIR y se compara con valores de referencia SR o con criterios definidos por la norma (ISO, 2022). La muestra de diseño experimental para SIR debe incluir replicados suficientes (recomendados duplicados en varias muestras/lotes y en días distintos) para estimar la variabilidad real en la matriz (Peris-Vicente et al., 2015; Eurachem, 2023).

2.6.4.4 Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

El LOD es la menor cantidad que puede detectarse con un nivel de confianza definido (probabilidad de detección); mientras que LOQ es el menor nivel que puede cuantificarse con precisión y exactitud aceptables (Eurachem, 2023). En microbiología el LOD/LOQ se determina frecuentemente por ensayos con diluciones seriadas (ISO, 2022) y mediante porcentaje de detección como

eLOD50. En matrices complejas la matriz puede aumentar el LOD por efecto de pérdida de recuperación o inhibición microbiana (Salmerón & Gutiérrez, 2021; Scharff & Farber, 2020).

2.6.4.5 Incertidumbre Combinada y Expandida

La incertidumbre de medición desempeña un papel fundamental en la estimación de la confiabilidad de los resultados analíticos en microbiología, especialmente en métodos de recuento como la detección de coliformes totales utilizando placas Petrifilm™. Aunque la microbiología presenta variabilidad inherente, la norma ISO/IEC 17025 exige que los laboratorios estimen y comprendan las fuentes de incertidumbre que pueden influir en el resultado final (Eurachem, 2023; ISO, 2017).

En el caso de Petrifilm™, la incertidumbre está asociada a factores como se muestra en la figura 2.1; como la homogeneización de la muestra, la recuperación microbiana, el volumen de inóculo, la lectura e interpretación de las colonias y las características propias de la matriz, como ocurre con la harina de camarón. Cada uno de estos elementos puede introducir variaciones que impactan el recuento obtenido (ISO, 2019; ISO, 2020; Scharff & Farber, 2020).

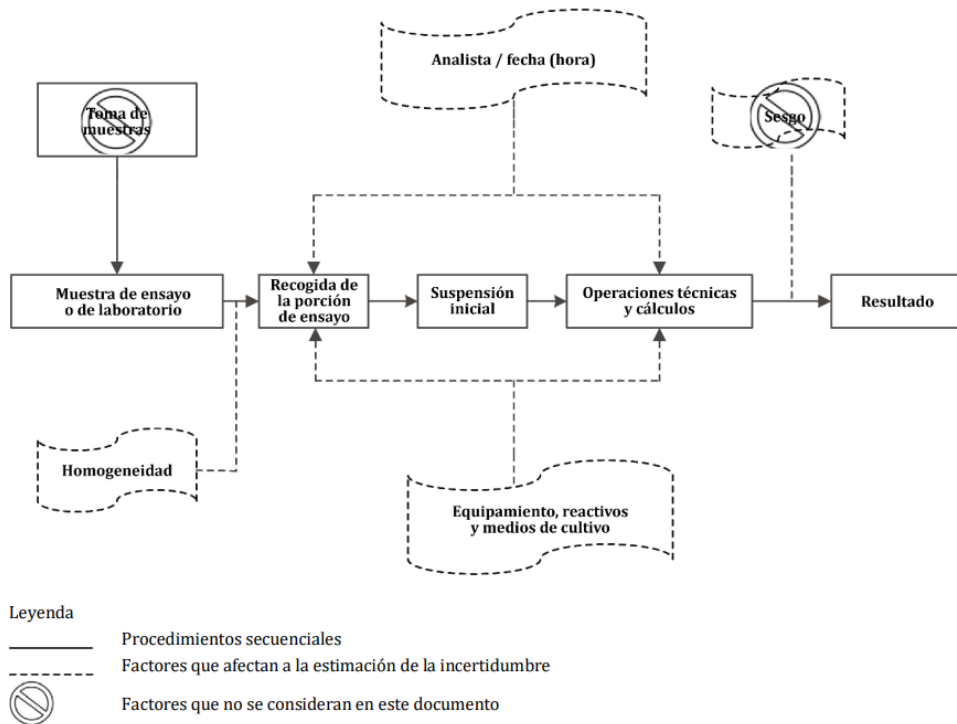


Figura 2.1 Principales fuentes de incertidumbre asociadas a microbiología de la cadena alimentaria

Fuente: (ISO, 2020)

Evaluar la incertidumbre permite determinar en qué medida un resultado refleja la condición microbiológica real de la muestra y cuánta variabilidad es razonable esperar bajo condiciones controladas. Este análisis fortalece la confiabilidad y comparabilidad de los resultados, respalda el cumplimiento de especificaciones microbiológicas y permite el seguimiento de tendencias dentro de sistemas de control de calidad (Eurachem, 2023; International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 2018; International Organization for Standardization, 2017; International Organization for Standardization. (Comité técnico CTN 34 Productos alimentarios), 2019; ISO, 2020).

a. Incertidumbre Típica Combinada

Para métodos microbiológicos en alimentos la ISO 19036:2020 ha considerado tres tipos de componentes de incertidumbre:

1. La incertidumbre técnica
2. La incertidumbre de la matriz
3. La incertidumbre de la distribución.

Según el caso el laboratorio puede utilizar dos formas de estimar la incertidumbre por medio de la combinación de los de los tres componentes o solo por medio de incertidumbre técnica. (ISO, 2020)

1. **La incertidumbre técnica**: procede de la variabilidad experimental y se estima a partir de una desviación típica de la reproducibilidad del resultado final del proceso de medición. (ISO, 2020)

Existen tres posibilidades distintas de estimación de la desviación típica de la reproducibilidad. Se basan en la repetición de mediciones realizadas sobre un material teóricamente idéntico. El orden de preferencia es el siguiente:

- Opción 1: reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia), es decir, la reproducibilidad estimada dentro de un mismo laboratorio (SIR).
- Opción 2: reproducibilidad procedente de los resultados de un estudio interlaboratorios de validación del método.
- Opción 3: reproducibilidad procedente de los resultados de un ensayo de aptitud (EA) interlaboratorios (EA) (ISO, 2020).

2. **La incertidumbre de la matriz**: procede de que la mezcla de la muestra de laboratorio no es perfecta, lo cual resulta en una baja reproducibilidad de los niveles de microorganismos entre porciones de ensayo; puede ser grande en el caso de las matrices sólidas y en especial en los productos alimenticios compuestos. La estimación de la incertidumbre de la matriz se realiza para cada tipo de matriz. (ISO, 2020)

3. **La Incertidumbre de la distribución**: la distribución aleatoria de los microorganismos en los materiales homogéneos.(ISO, 2020)

La relevancia de cada uno depende del método utilizado como para las técnicas de recuento de colonias:

- La incertidumbre de Poisson:

En los métodos analíticos que se fundamentan en el recuento de colonias, la incertidumbre asociada a la distribución estadística es generalmente baja y está directamente relacionada con el número total de colonias contabilizadas

para el cálculo del resultado. Esta contribución de incertidumbre disminuye a medida que aumenta el número de colonias observadas.

La Tabla 2 de la figura 2.2 presenta los valores característicos de la incertidumbre de tipo Poisson (u_{Poisson}), expresados en unidades \log_{10} , correspondientes a recuentos totales (ΣC) comprendidos entre 1 y 40 colonias. Cuando el recuento total es igual a cero, es decir, cuando no se detecta ninguna colonia, la incertidumbre de Poisson adopta un valor de 0,434 en escala logarítmica. (ISO, 2020)

Tabla 2 - Valores de u_{Poisson} para valores de ΣC comprendidos entre 1 y 40

| ΣC | u_{Poisson} | ΣC | u_{Poisson} | ΣC | u_{Poisson} | ΣC | u_{Poisson} |
|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|
| 1 | 0,434 | 11 | 0,131 | 21 | 0,095 | 31 | 0,078 |
| 2 | 0,307 | 12 | 0,125 | 22 | 0,093 | 32 | 0,077 |
| 3 | 0,251 | 13 | 0,120 | 23 | 0,091 | 33 | 0,076 |
| 4 | 0,217 | 14 | 0,116 | 24 | 0,089 | 34 | 0,074 |
| 5 | 0,194 | 15 | 0,112 | 25 | 0,087 | 35 | 0,073 |
| 6 | 0,177 | 16 | 0,109 | 26 | 0,085 | 36 | 0,072 |
| 7 | 0,164 | 17 | 0,105 | 27 | 0,084 | 37 | 0,071 |
| 8 | 0,154 | 18 | 0,102 | 28 | 0,082 | 38 | 0,070 |
| 9 | 0,145 | 19 | 0,100 | 29 | 0,081 | 39 | 0,070 |
| 10 | 0,137 | 20 | 0,097 | 30 | 0,079 | 40 | 0,069 |

Figura 2. 2 Tabla de Valores de u_{Poisson} para valores ΣC comprendidos entre 1 y 40

Fuente: ISO 19036:2020

Para valores distintos de ΣC , u_{Poisson} se puede calcular utilizando la ecuación 2.1:

$$u_{\text{Poisson}} = \frac{1}{\sqrt{\frac{\ln 10}{\Sigma C}}} \quad (2.1)$$

Para valores superiores de ΣC , el componente de la incertidumbre de Poisson se puede considerar despreciable si otros componentes de la incertidumbre son grandes.(ISO, 2020)

Para determinar la incertidumbre combinada en (y) se suman los aportes de incertidumbre al cuadrado y luego se le aplica raíz cuadrada como indica la siguiente ecuación 2.2:

$$u_2(y) = \sqrt{u_{tecn}^2 + u_{matriz}^2 + u_{Poisson}^2} \quad (2.2)$$

De manera general, se considera que la contribución de un componente de incertidumbre puede ser despreciada cuando su incertidumbre típica no supera una quinta parte del valor del componente dominante de incertidumbre. En aquellos casos en los que las incertidumbres asociadas a la matriz y a la distribución resultan insignificantes frente a la incertidumbre técnica, estas pueden excluirse del cálculo global. En una situación límite, donde todos los componentes de incertidumbre de la matriz y de la distribución son despreciables en comparación con la incertidumbre técnica, la incertidumbre combinada del resultado se reduce únicamente a la incertidumbre técnica, expresada como $u_c(y) = u_{técnica}$. (ISO, 2020)

Para este caso cuando se considera solo la incertidumbre técnica; está se encuentra directamente relacionada con desviación típica por reproducibilidad. La desviación típica de la reproducibilidad puede determinarse mediante cualquiera de los métodos establecidos en los procedimientos internos del laboratorio, descrito en literal a del numeral 1. cuando esta aproximación es compatible con los protocolos de calidad y con los requisitos definidos por el cliente, la incertidumbre típica combinada puede estimarse directamente a partir de la desviación estándar de la reproducibilidad, sin necesidad de aplicar correcciones adicionales. En estos casos, la incertidumbre del resultado se asimila directamente a la variabilidad observada entre mediciones reproducibles. (ISO, 2020)

$$u_c(y) = SIR$$

b. Incertidumbre Expandida

Para calcular la incertidumbre expandida U a partir de la incertidumbre típica combinada $u_2(y)$ y $u_c(y)$, utilizando el factor de cobertura $k=2$ (que corresponde aproximadamente a un nivel de confianza del 95%); se lo realizará con las siguientes ecuaciones 2.3 y 2.4 según sea el caso.

$$U = 2u_2(y) \quad (2.3)$$

$$U = 2u_c(y) \quad (2.4)$$

2.6.5 Relevancia de la verificación en este estudio

La verificación del método en este estudio es esencial para demostrar que la técnica Petrifilm™ AOAC 991.14 es realmente idónea para su aplicación en la harina de camarón, una matriz compleja que puede alterar el desempeño microbiológico del método si no se evalúa adecuadamente (ISO, 2022; Latimer, 2016). Los parámetros evaluados como la precisión, exactitud, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y cálculo de incertidumbre permiten establecer con evidencia técnica que el método es capaz de producir resultados confiables bajo las condiciones particulares de esta matriz (Eurachem, 2023).

La precisión proporciona información sobre la repetibilidad del método, es decir, sobre la capacidad de obtener resultados consistentes cuando el mismo analista, equipo y condiciones operan de manera controlada. En el contexto de la harina de camarón, donde la variabilidad natural de la muestra puede ser alta, demostrar precisión confirma que el método no amplifica la variabilidad inherente y que el laboratorio puede producir recuentos estables. (Peris-Vicente et al., 2015; López-Campos & et al., 2019)

La exactitud permite determinar qué tan cercano es el resultado obtenido al valor real o nominal. Al evaluarla en esta matriz, se busca verificar que el método no subestima ni sobreestima los recuentos de coliformes debido a interferencias propias de la harina de camarón, como el contenido proteico, grumos o lípidos que pueden afectar la recuperación microbiana (Scharff & Farber, 2020).

Los parámetros de LOD y LOQ son particularmente relevantes porque permiten definir la capacidad del método para detectar y cuantificar microorganismos en niveles bajos. En productos como la harina de camarón, donde se monitorean coliformes como indicadores de higiene, es indispensable conocer estos límites para asegurar que el laboratorio pueda detectar desviaciones tempranas en el proceso productivo (Eurachem, 2023; International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 2018).

En conjunto, la evaluación de estos parámetros permite demostrar científicamente la idoneidad del método para la matriz harina de camarón, cumpliendo con los requisitos de ISO/IEC 17025 y asegurando que los resultados generados en este proyecto son confiables, reproducibles y aplicables al control microbiológico de esta materia prima(International Organization for Standardization, 2017; Latimer, 2016).

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1 Enfoque de la investigación

3.1.1 Tipo de investigación

El tipo de investigación fue aplicada y experimental, ya que buscó resolver un problema concreto de control de calidad en la matriz de harina de camarón y, al mismo tiempo, permitió comparar el comportamiento de un método alternativo, AOAC 991.14 (Latimer, 2016) frente a los criterios de desempeño establecidos en normas de verificación de métodos microbiológicos (ISO, 2022).

3.1.2 Diseño de investigación

El diseño de investigación correspondió a un estudio experimental, ya que se manipularon condiciones controladas de análisis como la dilución, siembra y método utilizado con el fin de evaluar su efecto en los resultados de recuento de coliformes. Fue también un estudio prospectivo, porque los datos se generaron durante el desarrollo del trabajo a partir de ensayos previamente planificados. Además, se consideró como intralaboratorial, dado que la verificación se realizó dentro del mismo laboratorio, empleando su propia infraestructura, personal y condiciones operativas, tal como establece la ISO 16140-3 para la verificación por parte del usuario de un método alternativo.

3.2. Metodología

3.2.1 Variables

Para la verificación del método cuantitativo de recuento de coliformes en harina de camarón se consideraron las siguientes variables:

Variable independiente:

- Niveles de contaminación de coliformes: se estudiaron 3 niveles intermedio, bajo y blanco, en muestras naturales sin contaminación y ajustado mediante inoculación controlada en la matriz harina de camarón (\log_{10} UFC/g).
- Lote o muestra de harina de camarón: se estudiaron distintos lotes que representaron variabilidad real de la matriz.

Variable dependiente:

Respuesta del método como recuento de coliformes totales expresado como UFC/g y transformado a \log_{10} UFC/g para el análisis estadístico. Esta variable se utiliza para calcular las características de desempeño establecidas en la ISO 16140-3 mediante Petrifilm™ AOAC 991.14.

Variables de control:

- Temperatura de incubación
- Tiempo de incubación
- Diluyente empleado
- Homogeneización
- Volumen de inóculo
- Condiciones del analista
- Lote de placas

Estas variables se controlaron siguiendo las recomendaciones de ISO 7218 (ISO-7218-2024. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations., 2024), ISO 16140-3 (ISO, 2022) , AOAC 991.14 (Latimer, 2016) y el procedimiento del laboratorio.

3.2.2 Diseño experimental

El diseño experimental se basó a en los lineamientos de la ISO 16140-3 (ISO, 2022), que estableció los criterios para la verificación de métodos alternativos; permitió estimar las características de desempeño analítico como exactitud, precisión intermedia, LOD/LOQ, inclusividad, exclusividad e incertidumbre en la matriz harina de camarón bajo las condiciones reales del laboratorio.

El proceso de experimentación se estructuró de la siguiente manera:

1. Preparación de las muestras:

Se seleccionaron muestras de diferentes lotes de harina de camarón ingresadas al laboratorio de servicio. Se tomaron las porciones adecuadas siguiendo la guía ISO 6887, empleando técnicas de homogeneización adecuadas y diluciones decimales en diluyente estéril, garantizando condiciones apropiadas para el análisis microbiológico y la obtención de resultados confiables.

2. Condiciones Experimentales: Se establecieron las condiciones experimentales óptimas para el recuento de coliformes totales, de acuerdo con el método AOAC 991.14 (Petrifilm™ Coliform Count Plate). Estas condiciones incluyeron el volumen de inoculación, el tiempo y la temperatura de incubación, así como los criterios de lectura e interpretación de colonias características, considerando las particularidades de la matriz harina de camarón.

3. Ensayos de Validación: Para la evaluación del desempeño del método, se llevaron a cabo los siguientes ensayos: Se realizaron análisis iniciales utilizando muestras control con niveles conocidos de contaminación, con el propósito de verificar la adecuada respuesta del sistema analítico. Las muestras de harina de camarón fueron analizadas en múltiples repeticiones, lo que permitió evaluar parámetros de desempeño como repetibilidad y precisión, de acuerdo con los lineamientos establecidos en la ISO 16140 y la ISO 7218.

4. Control Experimental: Se incluyeron controles de calidad durante todo el proceso analítico, tales como:

- Controles positivos con cepas indicadoras de coliformes.
- Controles negativos (blancos), consistentes en diluyentes estériles sin muestra, para descartar contaminaciones cruzadas o interferencias externas.

Estos controles permitieron asegurar la confiabilidad y trazabilidad de los resultados obtenidos.

5. Análisis de Datos: Los resultados del recuento de coliformes totales se analizaron mediante herramientas estadísticas para determinar la variabilidad, precisión y exactitud del método. Los datos se expresaron en UFC/g de harina de camarón, incluyendo el análisis de dispersión de resultados y la evaluación del desempeño del método en la matriz estudiada.

3.2.3 Recolección de datos

3.2.3.1 Métodos y técnicas

El análisis experimental se desarrolló en las instalaciones del área de microbiología del Laboratorio de ensayo de patología acuícola, en la ciudad de Guayaquil.

Las muestras fueron receptadas en el laboratorio e ingresadas por el área de recepción y entregadas al área de microbiología.

La recolección de datos se realizó utilizando un método microbiológico experimental cuantitativo basado en la técnica de recuentos de coliformes totales en placas petrifilm. El procedimiento se centra en la preparación y análisis de muestras de harina de camarón para el conteo de las unidades formadoras de colonias en 10 g de muestra. Los datos se obtuvieron en la cantidad de colonias presentes en las petrifilm y luego fueron multiplicados por la dilución de la siembra.

3.2.3.1.1 Procedimiento detallado de recolección de datos:

La recolección de datos se realizó a partir de los recuentos de coliformes obtenidos en cada ensayo como:

Recepción y preparación de muestra: Las muestras ingresaron al centro de recepción de muestras; las cuales fueron evaluadas según especificaciones para determinar si fueron aceptadas o rechazadas.

- Se pesaron 100 g de la muestra y se colocaron dentro de una funda estéril como contramuestra e identificaron con la información de la muestra.

- Se pesaron 10 g de la muestra y se colocaron en una funda estéril que contenía toda la información de la muestra de ensayo (código) para su identificación.
- Se añadieron 90 ml de solución fosfato monobásico de potasio con pH ajustado 7.2 y se agitó vigorosamente durante 1 minuto con un homogenizador (Stomacher) para obtener una dilución 1:10.
- Se dejó reposar de 3-5 minutos.
- Se preparó toda dilución decimal con 9 ml de solución fosfatomonobásico de potasio más 1 ml dilución anterior.
- Las diluciones de las muestras se realizaron de acuerdo con el criterio técnico del analista.

Inoculación

- Se colocaron la placa sobre una superficie plana y estuvieron aclimatizadas.
- Se levantó la película superior y se inoculó 1 ml de la dilución homogenizada en el centro de la placa.
- Se bajó con cuidado la película superior para evitar que atrapara burbujas de aire. No se dejó caer la película.
- Con el lado plano del esparcidor hacia abajo se presionó suavemente el centro de la placa donde se encontraba el inóculo para dispersarlo.
- Se dejó reposar durante 1 minuto para permitir que el gel solidificara.
- Se incubaron las placas caras arriba en grupos de no más de 20 placas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 h.

NOTA: Incube las placas caras arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente de agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

Lectura de placas (identificación y recuento)

Identificación

Las colonias coliformes que crecen en la Placa Petrifilm CC, producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El

gas atrapado alrededor de las colonias coliformes confirma su presencia durante la fermentación metabólica de la lactosa. Los coliformes son bacilos gramnegativos que producen ácido y gas durante la fermentación metabólica de la lactosa.

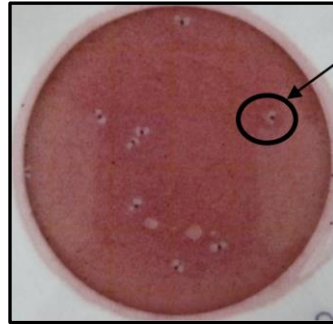


Figura 3.1. Lectura de colonias coliformes en placa petrifilm CC

Recuento de colonias en placas:

- Contar la cantidad de colonias presentes en la placa. El rango de recuento de población es de 15-150 UFC/g
- La cantidad de colonias por el recíproco de la dilución usada.
- En las placas con más de 150 colonias se debe realizar el conteo de la siguiente forma:
 - Seleccionar dos cuadrantes de 1cm² en la placa.
 - Contar las colonias en ambos cuadrantes
 - Multiplicar el conteo promedio determinado por 20 para obtener un recuento estimado; considerando que el área circular de crecimiento es aproximadamente 20 cm².
 - Calcular e promedio de ambos recuentos estimados.
 - Multiplicar el promedio calculado por el recíproco de la dilución usada.

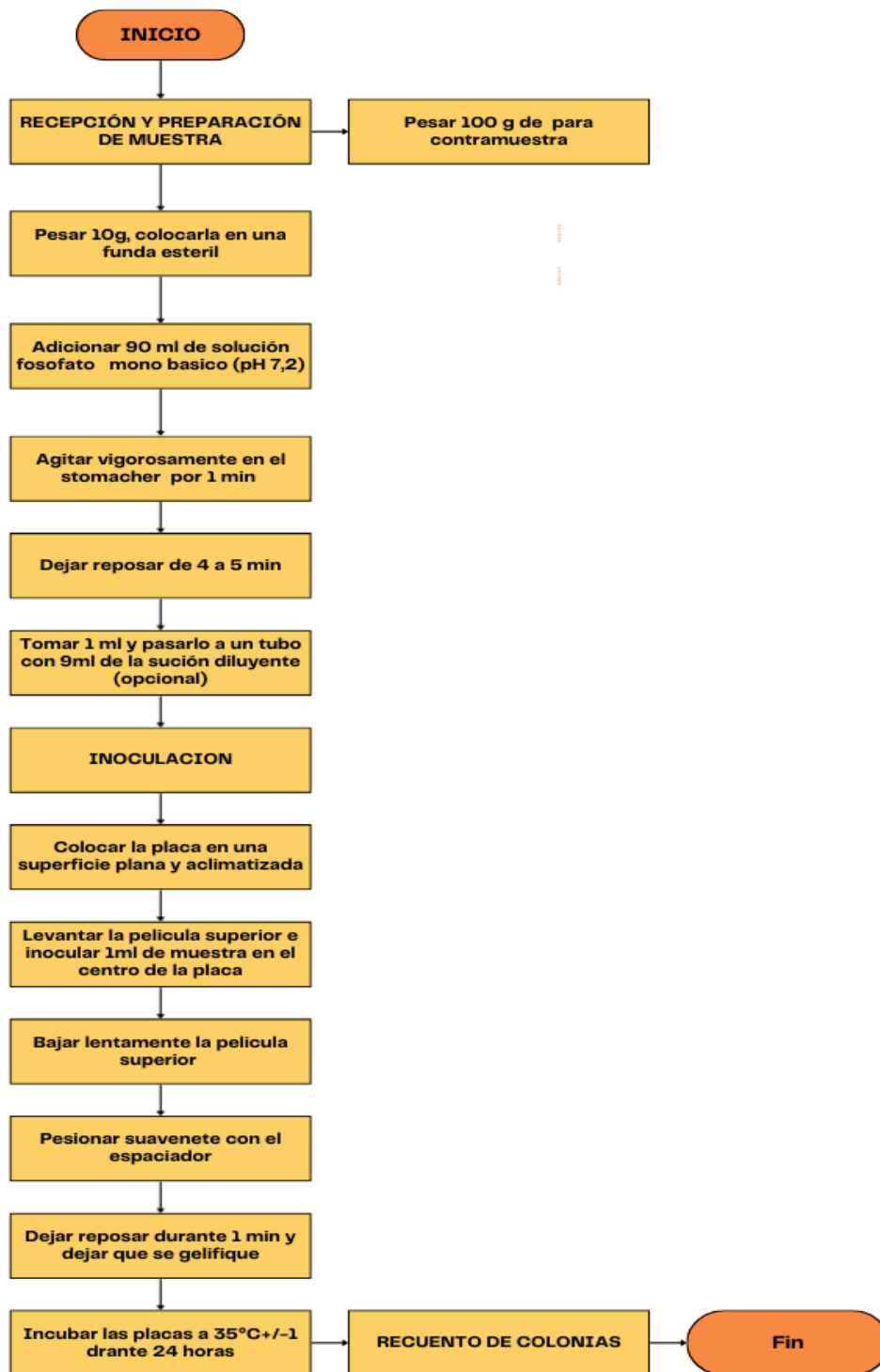


Figura 3.2. Diagrama de flujo del proceso.

3.2.3.1.2 Estructura de los ensayos de la validación

En el estudio se establece las siguientes condiciones:

- **Matriz en estudio:** harina de camarón destinada a alimentación animal; la cual fue analizada para identificar el grado de contaminación o si las muestras eran blancos naturales libres de contaminación de coliformes.

Se analizaron las muestras seleccionadas para determinar el grado de contaminación o si fueron muestras no contaminadas.

- **Niveles de contaminación:** se establecerán 3 niveles con preparación de inóculos según guía ISO 11133 (ISO, 2014); para determinación de característica de desempeño de LOD/LOQ.
 - Nivel 0 (blanco del recuento de coliformes).
 - Nivel 1 (baja concentración dentro del rango de trabajo del método).
 - Nivel 2 (concentración intermedia dentro del rango útil del método).

Para la determinación de SIR se realizaron 6 niveles de contaminación en muestras de diferentes lotes de harina de camarón.

En el caso del eBias se realizaron 3 niveles de contaminación en 3 muestras de diferentes lotes.

Y finalmente para la evaluación de la repetibilidad y veracidad se realizaron en 3 niveles de contaminación en una misma muestra con 2 analistas, analizando el mismo día.

- **Preparación de la cepa de trabajo:**

1. Activar la cepa de reserva; tomando una perla del cryobank y colocarla en 5 ml en un medio Brain Heart Infusion (BHI) e incubar toda la noche por 24 horas a temperatura de 35°C.
2. Se realiza una dilución que alcance una turbidez comparada con la escala de Mc Farland; ver figura 3.3; estableciendo una concentración aproximada de $1,3 \times 10^8$ UFC.



Figura 3.3 Test de turbidez

3. A partir de la primera dilución $1,3 \times 10^8$ se continuarán realizando diluciones sucesivas 1:10 con agua fosfatada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) con sus concentraciones respectivas (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1), ver figura 3.4.

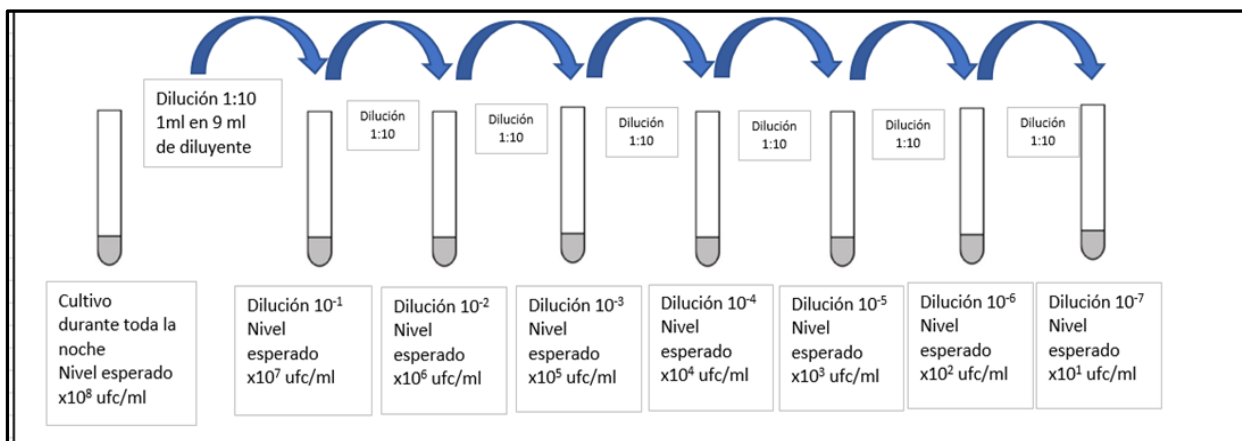


Figura 3. 4 Dilución de la concentración inicial de la cepa de trabajo.

4. Se sembrará la dilución 10^{-6} y 10^{-7} en el agar no selectivo Trypticase Soy Agar TSA; para determinar la concentración inicial del inóculo.

➤ **Número de muestras y replicados:**

Para cada nivel de contaminación se analizaron un conjunto de muestras de harina de camarón 12 unidades por nivel, con duplicado analítico por método, a fin de estimar variabilidad y precisión intralaboratorial. En el caso de eBias se utilizaron 3 muestras de

lotes diferentes, para determinar LOD se utilizaron la misma muestra contaminada en los niveles indicados.

Cada muestra fue procesada siguiendo el mismo protocolo de preparación (homogenización, diluciones seriadas y volumen inoculado), siguiendo la guía ISO 16140-3 (ISO, 2022). Para la correcta toma de porción de muestra se revisó la guía ISO 6887(ISO, 2025), ilustrada en la figura 3.5 y en la figura 7.1 (Anexo A)

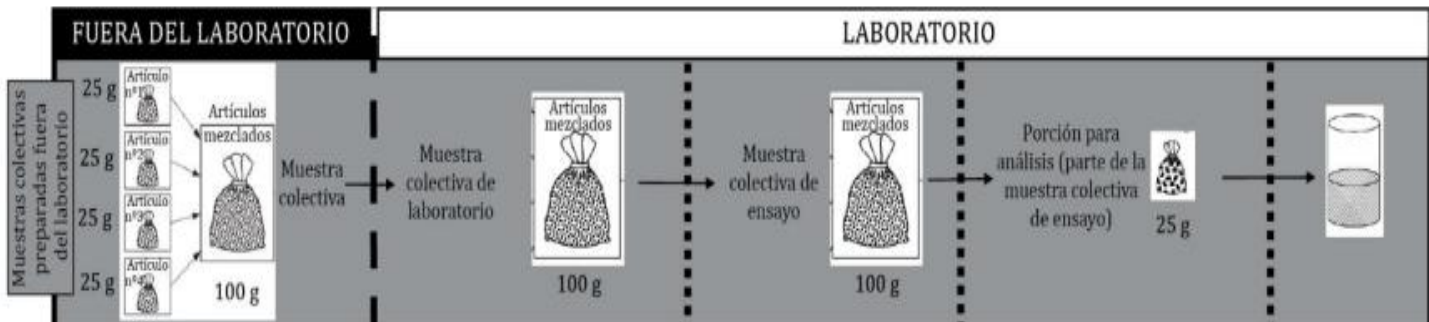


Figura 3. 5. Procedimientos para obtener muestras colectivas y combinadas.

Fuente: (International Organization for Standardization, 2025)

➤ **Transformación de datos:**

Los recuentos se expresan como Unidades Formadoras de colonias sobre gramos (UFC/g) y se transforman a \log_{10} para aplicar los criterios de exactitud y precisión definidos por ISO 16140-3.

➤ **Características de desempeño a evaluar**

Inclusividad y exclusividad

Se ensayan cepas objetivo (coliformes) y no objetivo para evaluar si el método detecta adecuadamente lo esperado sin falsos positivos.

Procedimiento:

1. Las muestras en blanco se contaminan con las cepas objetivo para determinar la inclusividad, como ilustra la siguiente tabla 3.1

Tabla 3.1 Cepas objetivos de estudio para estudio de inclusividad

| CEPA | ATCC | LOTE |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 25922 ^{TM*} | 335-540 ^{**} |
| <i>Klebsiella aerogenes</i> | 13048 | 306-339 ^{**} |

- Las muestras en blanco se contaminan con las cepas no objetivo para determinar la exclusividad, como ilustra la siguiente tabla 3.2

Tabla 3.2. Cepas no objetivas de estudio para la exclusividad

| CEPA | ATCC | LOTE |
|---|----------------------|-----------------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i> (serotype 4e) | 19118 ^{TM*} | 154-25 ^{**} |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 49132 ^{TM*} | 640-96 ^{**} |
| <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> serovar typhimurium | 14028 ^{TM*} | 363-592 ^{**} |
| <i>Shigella flexneri</i> (serotype 2b) | 12022 ^{TM*} | 356-106 ^{**} |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 17802 ^{TM*} | 818-92 ^{**} |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 29212 ^{TM*} | 366-431 ^{**} |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 27853 ^{TM*} | 353-496 ^{**} |
| <i>Shigella sonnei</i> | 25931 ^{TM*} | 303-102 ^{**} |

Límites de aceptabilidad:

Para cepas objetivos el conteo debe ser >10 y para cepas no objetivo no debe presentar colonias.

Exactitud:

Para evaluar la exactitud del método se lo realizó mediante la verificación del artículo (matriz de estudio) como la determinación la desviación estimada (eBias) y la veracidad mediante la recuperación de la siembra del inóculo en la muestra.

- Verificación del artículo: determinación de la desviación estimada (eBias).

Procedimiento:

1. Se prepara la cepa de trabajo en condiciones adecuadas (medio, temperatura y tiempo de inoculo) y se comprueba su pureza, con el fin de estimar el nivel de inoculación en un agar no selectivo como se ilustra en la figura 3.6 del Anexo D.3 (International Organization for Standardization (Comité técnico CTN 34 Productos alimentarios), 2022).

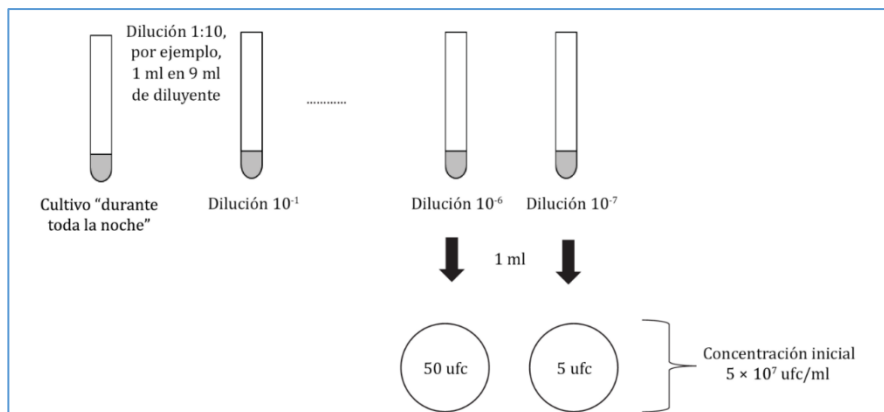


Figura 3.6 Ejemplo de una determinación preliminar del nivel de inóculo.

Fuente: (ISO, 2022)

2. Luego de obtener los microorganismos del numeral anterior se prepara diluciones seriadas para cubrir el rango amplio del supuesto inóculo de 10^{-1} a 10^{-7} UFC/ml como se ilustra en la figura 3.7 de anexo D4 (ISO, 2022)

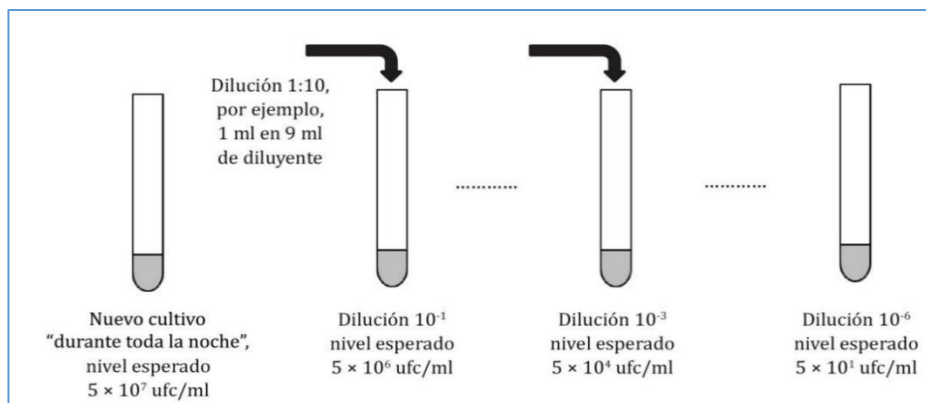


Figura 3.7 Ejemplo de preparación de inóculo.

Fuente: (International Organization for Standardization (Comité técnico CTN 34 Productos alimentarios), 2022)

3. Se inocula 1 ml de cada dilución en suspensiones iniciales por duplicados para obtener concentraciones finales de 10^1 UFC/ml, 10^3 UFC/ml y 10^5 UC como se ilustra en la figura 3.8 del anexo D5 y en tabla 3.3.

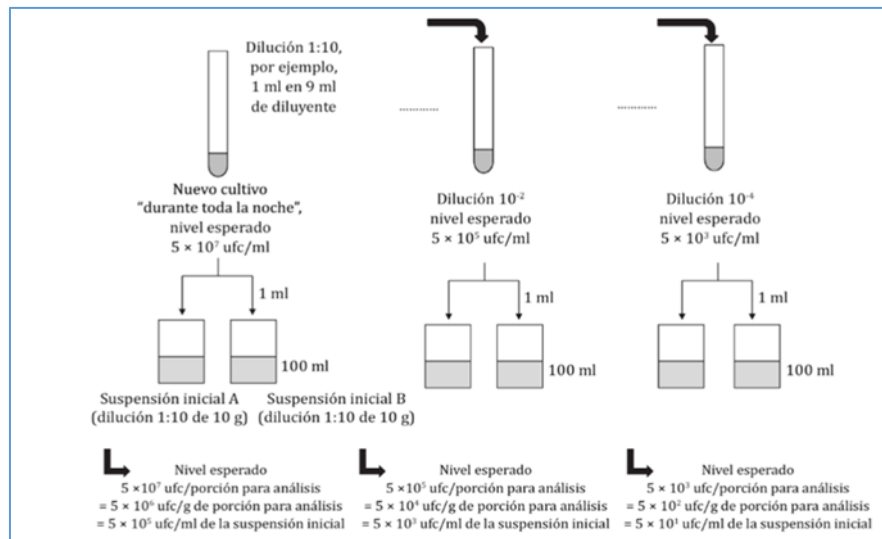


Figura 3. 8 Ejemplo de Inoculación de las porciones de análisis.

Fuente:(ISO, 2022)

Tabla 3.3. Concentración de los inóculos con y sin muestra más el diluyente

| Nivel esperado/porción de análisis | 10 g Muestra+1 ml inóculo+90 ml diluyente | Inocuo en 100 ml de diluyente |
|------------------------------------|---|-------------------------------|
| 10^7 | 10^6 | 10^5 |
| 10^5 | 10^4 | 10^3 |
| 10^3 | 10^2 | 10^1 |

4. Se realizó la verificación del método utilizando contaminación artificial como se ilustra en la figura 3.9 del anexo D6 que se realizará utilizando de método a verificar (ISO, 2022):
- La porción inicial sin inocular
 - Las porciones para análisis inoculadas (A y B)
 - La suspensión de inóculo utilizada para preparar la suspensión inicial.

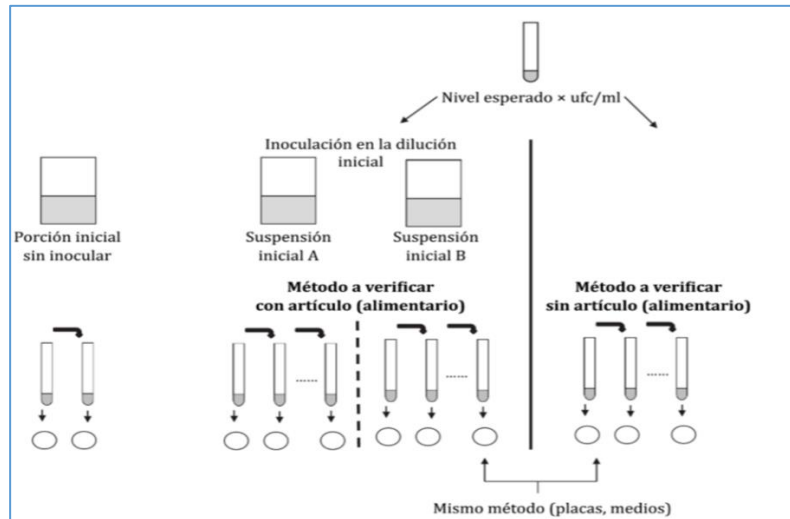


Figura 3. 9 Ejemplo de verificación del método cuantitativo (eBias) utilizando contaminación artificial.

Fuente: (ISO, 2022)

5. Se comparan los resultados de la porción contaminada con los resultados de la suspensión de inóculo analizada con el mismo método.

Límites de aceptabilidad:

La diferencia absoluta entre el \log_{10} UFC/ml (suspensión del inóculo)-promedio \log_{10} UFC/ml (porción contaminada) debe ser $\leq 0,5 \log_{10}$ para cada uno de los niveles de inóculo (ISO, 2022).

- Veracidad:

La veracidad del método será evaluada mediante el porcentaje de recuperación del inóculo sobre la muestra.

Procedimiento:

1. Se prepara la cepa de trabajo en condiciones adecuadas (medio, temperatura y tiempo de inóculo) y se comprueba su pureza, con el fin de estimar el nivel de inoculación en un agar no selectivo
2. Se realiza las respectivas diluciones correspondiente al nivel A, B y C.
3. Se siembra 10 veces la muestra inoculada, por 2 analistas.

La veracidad es expresada como el porcentaje de recuperación, se calcula por la ecuación 3.1:

$$\%Rec = 10(\text{promedio de muestra contaminada-inocule}) * 100 \quad (3.1)$$

Precisión:

Para evaluar esta característica de desempeño se realizó mediante la verificación de la implementación determinando la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (SIR) y también la repetibilidad y la precisión intermedia (%CV).

La verificación de la implementación se realizó en un solo laboratorio y la reproducibilidad se expresó como desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (SIR) (ISO, 2022).

Procedimiento:

1. Se seleccionarán 12 muestras de harina de camarón de diferentes lotes que serán identificadas que deben ser mezcladas y homogenizadas en dos porciones y analizadas para confirmar su nivel de contaminación.
2. Las muestras serán contaminadas con la suspensión del inóculo de un nivel conocido de cepa; como se ilustra en la figura 3.10 (ISO, 2022).

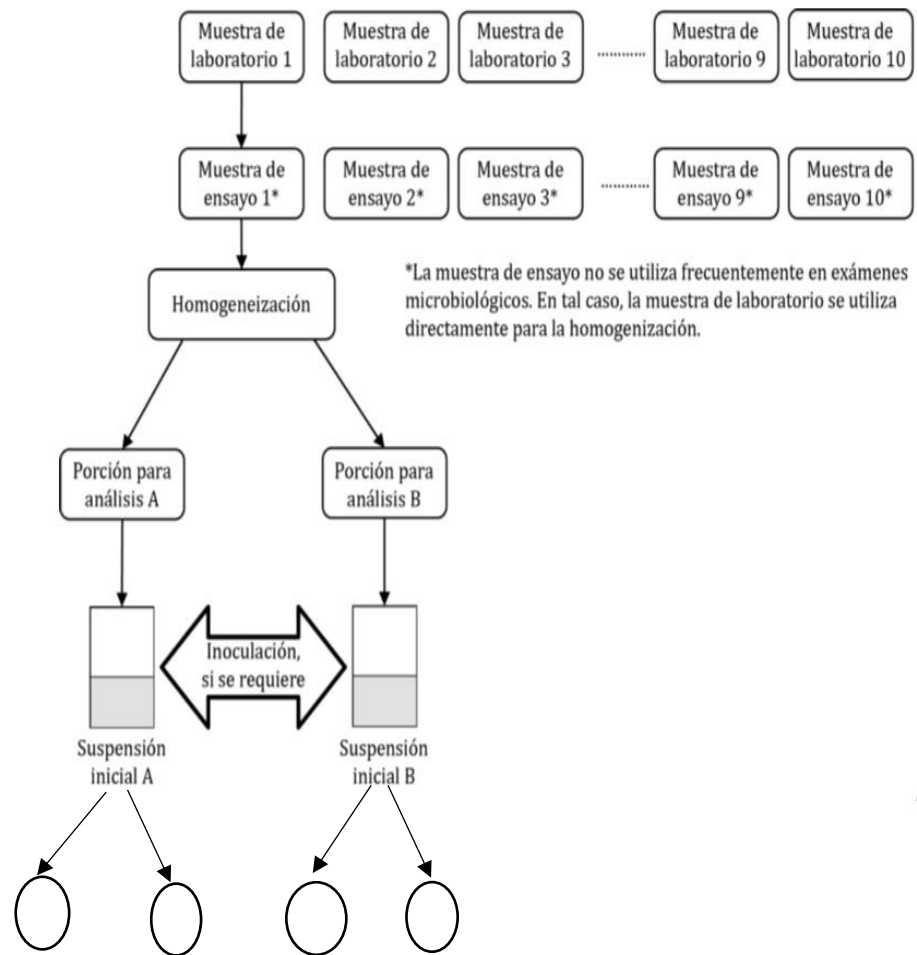


Figura 3. 10 Protocolo de estudio para estimar la desviación estándar de la reproducibilidad.

Fuente: (ISO, 2022)

3. Se calcula la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (SIR) de los datos resultantes mediante la siguiente ecuación o mediante el programa de Excel.

$$SIR = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2} \quad (3.2)$$

Determinar la desviación estándar de la reproducibilidad

Donde:

SIR: es la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio

i: índice de la muestra de laboratorio

n: número de muestra (12)

y_{1A}, y_{1B}: son los datos transformados logarítmicamente, en log₁₀ (UFC/g). A=analista 1 y B=analista 2

Límites de aceptabilidad:

La desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio (SRI) de método verificado debe ser <2, el valor medio más bajo de la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio que lo proporciona el método (SR).

- Precisión (repetibilidad y precisión intermedia):

La precisión se establece en términos de repetibilidad y precisión intermedia, medidos en función de 3 niveles de contaminación: 150 UFC/g (Nivel A), 30 UFC/g (Nivel B), 10 UFC/g (Nivel C).

Repetibilidad: grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo las mismas condiciones de medición (mismo analista mismo método)

Procedimiento:

1. Se seleccionaron una muestra de harina de camarón que fueron identificadas mezcladas y homogenizadas.
2. Las muestras fueron contaminadas con la suspensión del inóculo de un nivel conocido de cepa; como se ilustró en la figura 3.6 (ISO, 2022).

3. Se determinó de desviación estándar para cada nivel de contaminación, calcule el %CV para cada nivel, 10 veces el mismo día, el mismo analista y equipos.
4. *Precisión intermedia*: Se analizaron 10 veces cada una de los niveles analizados bajo las mismas condiciones el analista 1, por un analista diferente (analista 2)

Para determinar la repetibilidad de los datos obtenidos se expresaron en porcentaje de coeficiente de variación mediante la ecuación 3.3:

$$\%CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \quad (3.3)$$

Determinación de porcentaje de coeficiente de variación

donde S es la desviación estándar y \bar{X} es el promedio de las mediciones.

Para determinar la precisión intermedia los valores obtenidos se promedian entre el 1° analista con los datos del 2° analista y los resultados se expresarán en porcentaje de coeficiente de variación (%CV). Para la aceptación del estudio los resultados fueron $\leq 49,5$ % dato referenciado de la figura 7.2 (Anexo B).

Determinación del LOD/LOQ

Para esta determinación se evaluará con el protocolo 2 (ISO 16140-3); debido a que las muestras son naturales sin contaminación; considerando que no hay información LOD del método de referencia.

Procedimiento:

Se seleccionan 2 niveles de contaminación, alrededor del punto en que el método presenta detección parcial (Nivel 0=Blanco:<10, Nivel 1=10 UFC/g y Nivel 2=100 UFC/g). Preparando las siguientes diluciones en la tabla 3.4:

Tabla 3.4 Niveles de contaminación, dilución e inóculo.

| Niveles | Concentración de contaminación | Dilución | Inoculo utilizado para la dilución |
|------------------|--------------------------------|----------|------------------------------------|
| Intermedio. 2 | 10^2 | 1:3 | 10^3 |
| Bajo: 1 | 10 | 1:3 | 10^2 |
| Blanco: 0 | 0 | 0 | 0 |

1. Cada nivel se evalúa con 5 réplicas, el mismo analista y muestra.
2. Los resultados se evalúan según el número de resultados positivos obtenidos en cada nivel de inóculo.

Límites de aceptabilidad:

Se evaluó el valor mínimo que detecta el método 10 UFC/g

Incertidumbre Expandida

Se determinó la incertidumbre expandida mediante el aporte de los componentes como en la figura 3.11 siguiendo el procedimiento:

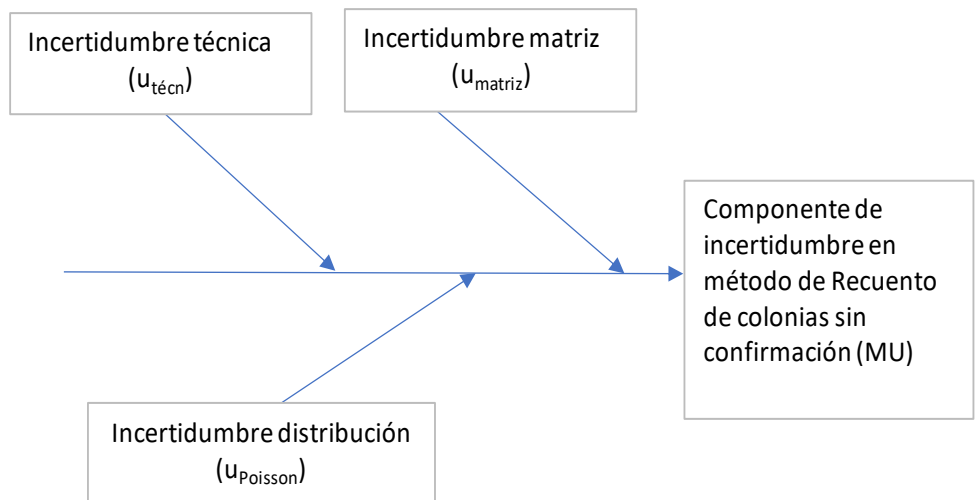


Figura 3. 11 Diagrama de espina de pescado de los componentes de incertidumbre del método.

Procedimiento:

1. Se calcula la incertidumbre combina; mediante la raíz de la sumatoria de la incertidumbre técnica $(u_{técn})^2$, incertidumbre matriz $(u_{matriz})^2$ e incertidumbre distribución $(u_{Poisson})^2$; como indica la ecuación (3.4).

$$u_c(y) = \sqrt{u_{técn}^2 + u_{matriz}^2 + u_{Poisson}^2} \quad (3.4)$$

- 1.1 El cálculo de la incertidumbre técnica fue calculado con la siembra de 10 muestras y cada muestra fue separa en 2 porciones A y B y se varió las condiciones de A y B como muestra la figura 7.3 (Anexo C).

- 1.1.1 El diseño experimental incluyó dos factores de variación independientes (analista y lote de diluyente), combinados de forma cruzada entre las porciones de ensayo con el fin de capturar la variabilidad técnica global del método, sin descomponer los efectos individuales, conforme a ISO 19036:2020; como se indica en la tabla 3.5

Tabla 3.5 Variaciones experimentales de la porción A y B.

| Muestra | Porción A | Porción B |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
| M1 | Analista 1 – Diluyente D1 | Analista 2 – Diluyente D2 |
| M2 | Analista 2 – Diluyente D1 | Analista 1 – Diluyente D2 |
| M3 | Analista 1 – Diluyente D2 | Analista 2 – Diluyente D1 |
| M4 | Analista 2 – Diluyente D2 | Analista 1 – Diluyente D1 |
| M5 | Analista 1 – Diluyente D1 | Analista 2 – Diluyente D2 |
| M6 | Analista 2 – Diluyente D1 | Analista 1 – Diluyente D2 |
| M7 | Analista 1 – Diluyente D2 | Analista 2 – Diluyente D1 |
| M8 | Analista 2 – Diluyente D2 | Analista 1 – Diluyente D1 |
| M9 | Analista 1 – Diluyente D1 | Analista 2 – Diluyente D2 |
| M10 | Analista 2 – Diluyente D1 | Analista 1 – Diluyente D2 |

- 1.1.2 Cada porción de ensayo se analizó por duplicado mediante dos diluciones réplica, con el fin de reducir la variabilidad asociada al pipeteo, siembra y recuento.

Las diluciones se prepararon según la condición que la norma 19036:2020 establece que el límite de 30 colonias hace referencia a la suma del número total de colonias contadas en todas las placas conservadas, ΣC , para cada resultado individual. Deberían excluirse los resultados de recuentos basados en menos de 30 colonias contadas, así como los recuentos por encima del número máximo por placa 300 UFC/placa o inferior.

- 1.1.3 Se calculó la media ponderada del resultado del recuento de colonias en ufc/g para cada factor según la siguiente ecuación (3.5) y transformarlo a \log_{10}

$$X_{1A0B} = 10^{d1} * \frac{\Sigma C_{1A0B}}{1,1} \quad (3.5)$$

- 1.1.4 Se calculó el cuadrado de la diferencia, según ecuación (3.6)

$$(y_{1A} - y_{1B})^2 \quad (3.6)$$

- 1.1.5 Se calculó la desviación estándar intralaboratorio (S_{IR}) como indica la ecuación (3.7), donde n es el número de muestra

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \Sigma_{i=1}^n (y_{1A} - y_{1B})^2} \quad (3.7)$$

- 1.2 Se calculó la incertidumbre de la matriz (U_{matriz}); mediante el diseño que se muestra en figura 7.4 (Anexo C)

- 1.2.1 Se realizó el estudio con 11 porciones a partir de una única muestra de laboratorio conservando las mismas condiciones como indica la tabla 3.6.

Tabla 3.6 Condiciones de repetibilidad.

| Porción | Analista | Diluyente | Petrifilm | Día |
|---------|----------|-----------|-----------|-------|
| P1 | A1 | D1 | Lote P1 | Día 1 |
| P2 | A1 | D1 | Lote P1 | Día 1 |
| P3 | A1 | D1 | Lote P1 | Día 1 |
| P4 | A1 | D1 | Lote P1 | Día 1 |
| P5 | A1 | D1 | Lote P1 | Día 1 |
| P6 | A1 | D1 | Lote P1 | Día 1 |
| P7 | A1 | D1 | Lote P1 | Día 1 |
| P8 | A1 | D1 | Lote P1 | Día 1 |
| P9 | A1 | D1 | Lote P1 | Día 1 |
| P10 | A1 | D1 | Lote P1 | Día 1 |
| P11 | A1 | D1 | Lote P1 | Día 1 |

1.2.2 Cada porción de ensayo se analizó por duplicado mediante dos diluciones réplica, con el fin de reducir la variabilidad asociada al pipeteo, siembra y recuento.

Las diluciones se prepararon según la condición que la norma 19036:2020 establece que el límite de 30 colonias hace referencia a la suma del número total de colonias contadas en todas las placas conservadas, ΣC , para cada resultado individual. Deberían excluirse los resultados de recuentos basados en menos de 30 colonias contadas, así como los recuentos por encima del número máximo por placa 300 UFC/placa o inferior.

1.2.3 Se calculó la media ponderada del resultado del recuento de colonias en ufc/g para cada factor según la siguiente ecuación (3.8) y transformarlo a \log_{10}

$$X_{1A0B} = 10^{d1} * \frac{\sum C_{1A0B}}{1,1} \quad (3.8)$$

1.2.4 Se calculó el recuento medio \log_{10} (promedio) ver ecuación (3.9)

$$\text{Recuento medio } \log_{10} = \frac{\text{recuento A } \log_{10} + \text{recuento B } \log_{10}}{2} \quad (3.9)$$

1.2.5 Se calculó cuadrado de las diferencias respecto a la media, según ecuación (3.10)

$$(\text{recuento medio } \log_{10} - \text{recuento } A \log_{10})^2 \quad (3.10)$$

1.2.6 Se calculó la desviación estándar intralaboratorio (S_{IR}) como indica la ecuación (3.11), donde n es el número de muestra

$$S_{IR} \text{ o } S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{p_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (p_i - 1)}} \quad (3.11)$$

Donde

i=identificador de la muestra de laboratorio

j= identificador de la porción de ensayo de la muestra i

$y_{ij} = \log_{10} x_{ij}$

1.3 Se calculó la incertidumbre por distribución a partir de los valores que conforman cada resultado individual. Para técnica de recuento de colonias existe una contribución mínima de incertidumbre de la distribución que depende del número total de colonias contadas utilizadas en el cálculo de los resultados, ΣC . Para valores de recuento (ΣC) comprendidos entre 1 y 40, ver figura 3.12, se visualiza valores de la incertidumbre típica de Poisson, u_{Poisson} , en unidades \log_{10} ,

Si $\Sigma C = 0$, es decir, no se ha contado ninguna colonia, $u_{\text{Poisson}} = 0,434$.

| ΣC | u_{Poisson} | ΣC | u_{Poisson} | ΣC | u_{Poisson} | ΣC | u_{Poisson} |
|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|
| 1 | 0,434 | 11 | 0,131 | 21 | 0,095 | 31 | 0,078 |
| 2 | 0,307 | 12 | 0,125 | 22 | 0,093 | 32 | 0,077 |
| 3 | 0,251 | 13 | 0,120 | 23 | 0,091 | 33 | 0,076 |
| 4 | 0,217 | 14 | 0,116 | 24 | 0,089 | 34 | 0,074 |
| 5 | 0,194 | 15 | 0,112 | 25 | 0,087 | 35 | 0,073 |
| 6 | 0,177 | 16 | 0,109 | 26 | 0,085 | 36 | 0,072 |
| 7 | 0,164 | 17 | 0,105 | 27 | 0,084 | 37 | 0,071 |
| 8 | 0,154 | 18 | 0,102 | 28 | 0,082 | 38 | 0,070 |
| 9 | 0,145 | 19 | 0,100 | 29 | 0,081 | 39 | 0,070 |
| 10 | 0,137 | 20 | 0,097 | 30 | 0,079 | 40 | 0,069 |

Figura 3. 12 Valores de u_{Poisson} para valores ΣC comprendidos entre 1 y 40.

Fuente:(ISO, 2020)

Para valores distintos de ΣC , u_{Poisson} se calculó utilizando la ecuación (3.12)

$$u_{\text{poisson}} = \frac{\frac{1}{\log_{10}}}{\sqrt{\Sigma C}} = \frac{0,4343}{\sqrt{\Sigma C}} \quad (3.12)$$

2. Se calculó la incertidumbre expandida según ecuación (3.13), con un nivel de confianza 95% $k=2$

$$U = u_c(y) * k \quad (3.13)$$

Una vez se ha calculado la MU expandida puede expresarse en el informe de ensayo junto con el resultado del ensayo, como un intervalo en escala log10 o como valores en números naturales (UFC/g o UFC/ml), como ilustran los siguientes ejemplos alternativos: (ISO, 2020)

- a) log10 del resultado con $\pm U$: $y \pm U \log_{10} \text{ ufc/g o ufc/ml}$;
- b) log10 del resultado con límites: $y \log_{10} \text{ ufc/g o ufc/ml}$ [$y - U$; $y + U$];
- c) resultado en números naturales con límites: $x \text{ ufc/g o ufc/ml}$ [$10y - U$; $10y + U$];

Límites de aceptabilidad:

Se acepta que el efecto de un componente es despreciable si su incertidumbre típica no es superior a un quinto de la magnitud del componente más grande de incertidumbre típica. Si los componentes de incertidumbre de la matriz y de la distribución son despreciables en comparación con la incertidumbre técnica, se pueden ignorar. En el caso extremo en el que todos los componentes de incertidumbre de la matriz y de la distribución son despreciables en comparación con la incertidumbre técnica se reducen a $u_c(y) =$

$U_{técn.}$

3.2.3.2 Recursos

- ❖ Los recursos materiales utilizados son equipos, insumos y materiales medios de cultivos y cepas.

Equipos

- pH-metro Marca: Orión.
- Incubadora Marca: Labtech
- Calentador Marca: Fisher Scientific
- Autoclave Marca: GCA
- Autoclave Marca: Yamato
- Balanza Analítica Marca: DENVER
- Balanza Gramera Marca: Boeco
- Balanza Gramera Marca: SARTORIUS
- Refrigeradora Marca: Thermo Scientific
- Refrigeradora Marca: Indurama
- Contador de colonias Marca: Québec
- Cámara de Flujo Laminar Marca: LABCONCO

Insumos y materiales

- Micropipeta 1000 ul Marca: Transferpette
- Frascos 250 ml Pyrex
- Probeta 1000 ml Pyrex
- Probeta 250 ml Pyrex

- Placa de recuento para coliformes totales (CC). 3M

Medios de dilución y cultivo

- Agua destilada.
- Fosfato Monobásico de Potasio KH_2PO_4 Marca: JT Baker
- BBL Brain Heart Infusion Marca Difco
- BBL Trypticase Soy Agar Difco

Cepas utilizadas:

- *Escherichia coli* ATCC: 25922™*
- *Klebsiella aerogenes* ATCC:13048
- *Listeria monocytogenes* (serotype 4e) ATCC: 19118™*
- *Proteus vulgaris* ATCC: 49132™*
- *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium* ATCC: 14028™*
- *Shigella flexneri* (serotype 2b) ATCC:12022™*
- *Vibrio parahaemolyticus* ATCC:17802™*
- *Enterococcus faecalis* ATCC: 29212™*
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC:27853™*
- *Shigella sonnei* ATCC: 25931™*

Elementos de seguridad

- Bata de laboratorio.
 - Guantes de Nitrilo.
 - Cofia
-
- ❖ Recursos humanos: personal de laboratorio capacitado en microbiología de alimentos y en el manejo del método Petrifilm™.
 - ❖ Recursos informáticos: hojas de cálculo o software estadístico para el tratamiento de datos (Excel).

3.2.4 Análisis estadístico

En este estudio, se aplicaron diversos cálculos con el fin de examinar las características de desempeño y verificar que el comportamiento del método cumple con los criterios de aceptabilidad.

3.2.4.1 Métodos de análisis

El análisis estadístico de los datos constituye un elemento clave para confirmar que los resultados obtenidos son adecuados para el método de recuentos de coliformes totales por placa petrifilm en harina de camarón; el cual incluye tanto análisis descriptivo como inferencial.

1. Análisis descriptivo:

- Se calcularon la media, desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para evaluar la precisión en diferentes niveles de concentración (A, B y C).
- Se calculó la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio (SIR) y se aplicó el criterio de aceptación con respecto al SR del método de la referencia. Esta característica nos permite evaluar la verificación de la implementación.
- El porcentaje de recuperación (%R) se utilizó para determinar la veracidad del método, evaluando el inóculo utilizado para la contaminación de la muestra y las muestras contaminadas artificialmente. Y para la evaluación de la verificación del producto mediante la estimación estándar (eBias).
- El límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se determinaron demostrando la detección en 10 UFC/g
- El cálculo de la incertidumbre se calculó por ecuaciones correspondientes a la desviación estándar intralaboratorio, con variables independientes y variables dependientes según el diseño experimental.

2. Análisis inferencial:

- Análisis de varianza (ANOVA): Se utilizó para confirmar que no hay diferencias significativas entre los niveles de concentración, tomando en cuenta lo siguiente:

Establecimiento de hipótesis:

- ✓ Hipótesis nula (H_0): Las diferencias entre las medias de los analistas no son significativas, y los datos son lineales.
- ✓ Hipótesis alternativa (H_1): Existen diferencias significativas entre las medias de los analistas, indicando que los datos no son lineales.

Criterio de decisión:

- ✓ Comparar el valor calculado de F con el valor crítico de la distribución F para $k-1$ y $n-k$ grados de libertad a un nivel de significancia $\alpha=0.05$.
- ✓ Si $F > F_{critico}$, se rechaza H_0 , indicando que los datos no son lineales.

Resultados del ANOVA

Si no se rechaza H_0 , se concluye que no hay diferencias significativas entre los analistas

Si se rechaza H_0 , los datos presentan desviaciones significativas en los resultados entre analistas.

En la tabla 3.7 podemos visualizar los criterios de aceptación de todas las características de desempeño a evaluar.

Tabla 3 7. Aceptación de todas las características de desempeño.

| Característica de Desempeño | Criterios de Aceptabilidad | Conclusión |
|-----------------------------|----------------------------|---|
| Inclusividad | Cepas estudiadas >10 UFC/g | Método de placas petrifilm para coliformes totales, identifica la cepa de objetivo de estudio |
| Exclusividad | Cepas estudiadas <10 UFC/g | |
| Límite de Detección (LOD) | >10 UFC/g | LOD=LOQ aceptable |

| | | |
|---|--|---|
| <p>Precisión:</p> <p>SIR (Desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio)</p> <p>ANOVA para reproducibilidad intralaboratorio</p> | <p>SIR <2*la desviación estándar de la reproducibilidad entre laboratorios (SR)</p> <p>%RSDIR o %CV</p> <p>Porcentaje debe ser ≤49.5%</p> <p>F(calculada)<Ftabla (crítico)</p> | <p>Aceptado en la verificación de la implementación.</p> <p>Se acepta y se establece como una condición de aseguramiento de calidad</p> <p>La variabilidad está dentro de los límites aceptables, precisión adecuada entre analistas.</p> |
| <p>Exactitud:</p> <p>Verificación del producto:</p> <p>eBias (Desviación estándar estimada)</p> <p>%Recuperación</p> | <p> Log10 ufc/ml (inoculo)-promedio log10 ufc/porción para análisis contaminado artificialmente ≤ 0,5</p> <p>log10 para cada uno de los niveles de inoculación.</p> <p>70-130%</p> | <p>Se acepta la matriz en estudio.</p> <p>Se acepta y se establece como una condición de aseguramiento de calidad.</p> |
| <p>Incertidumbre</p> | <p>≤0.5 log₁₀</p> | <p>Se acepta el valor de incertidumbre en log₁₀</p> |

3.2.4.2 Justificación del análisis

La estrategia estadística adoptada resulta esencial para asegurar la validez y la confiabilidad del método analítico. Los análisis previamente descritos permiten realizar una valoración inicial de la precisión y la exactitud del método, mientras que los análisis inferenciales facilitan la toma de decisiones sustentadas en hipótesis con respaldo estadístico. El análisis de varianza (ANOVA) es fundamental para identificar posibles fuentes de variabilidad y corroborar que las diferencias observadas entre los resultados no sean estadísticamente significativas.

3.2.4.3 Validación de resultados

El tratamiento estadístico realizado permite verificar que el método analítico cumple con los criterios normativos y científicos establecidos. A través de este análisis se confirma que el método presenta niveles adecuados de precisión y exactitud dentro del intervalo de trabajo definido y se demuestra que los analistas autorizados para este análisis no tienen diferencia significativa en sus resultados y se aporta un sustento cuantitativo confiable para la

determinación de los límites e indicadores de desempeño del método. Estos procedimientos se encuentran alineados con las recomendaciones de EURACHEM, la norma ISO 16140-3 y la norma ISO 19036:2020, lo que asegura que los resultados obtenidos sean confiables y aplicables al análisis rutinario de muestras de harina de camarón.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Protocolo de validación (características de desempeño).

Se estructuró y documentó un protocolo técnico de verificación del método AOAC 991.14 para el recuento de coliformes totales en harina de camarón mediante placas Petrifilm™, conforme a los lineamientos establecidos en la norma ISO 16140-3:2021 y en concordancia con los requisitos de la norma ISO/IEC 17025:2017.

El protocolo diseñado definió de manera sistemática las características de desempeño analítico a evaluar, así como los objetivos de calidad asociados a cada una de ellas, considerando las particularidades de la matriz harina de camarón y las condiciones reales de operación del laboratorio. Para ello, se estableció un diseño experimental que contempló niveles controlados de contaminación, replicación adecuada, control de variables críticas del proceso analítico y el uso de herramientas estadísticas apropiadas para la interpretación de los resultados. Se describe un protocolo de validación en el anexo D.

Las características de desempeño incluidas en el protocolo fueron: inclusividad, exclusividad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio), exactitud (sesgo), límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), así como la estimación de la incertidumbre de medición. Para cada parámetro se definieron criterios de aceptación basados en referencias normativas internacionales, principalmente la ISO 16140-3:2021 y la ISO 19036:2020, garantizando que los objetivos de calidad fueran coherentes con el uso previsto del método en el control microbiológico de alimentos para alimentación animal.

El protocolo contempló además la estandarización de las etapas críticas del análisis, tales como la preparación de la muestra, homogeneización, selección de diluciones, condiciones de incubación, criterios de lectura e interpretación de colonias, así como la implementación de controles positivos y negativos. De esta manera, se aseguró la trazabilidad del proceso analítico y la minimización de fuentes de variabilidad asociadas al analista, al equipamiento y a la matriz.

Como resultado, el protocolo de validación diseñado permitió establecer un marco técnico robusto para la evaluación del desempeño del método AOAC 991.14 en harina de camarón, definiendo claramente los objetivos de calidad esperados para cada característica analítica. Este protocolo constituye la base metodológica para generar resultados confiables, reproducibles y técnicamente válidos, y respalda la correcta implementación del método dentro del sistema de gestión de calidad del laboratorio.

4.2 Evaluación del desempeño del método Petrifilm en harina de camarón

De acuerdo con el diseño experimental y los procedimientos descritos, se evaluaron las características de desempeño analítico del método AOAC 991.14 mediante placas Petrifilm™ para el recuento de coliformes totales en la matriz harina de camarón, utilizando herramientas estadísticas conforme a los lineamientos establecidos en la norma ISO 16140-3:2021 y a los requisitos de la norma ISO/IEC 17025:2017. Para esta evaluación se seleccionaron muestras que fueron analizadas para verificar su nivel de contaminación; las cuales se evidenciaron que fueron muestras naturales libres de coliformes totales; como se muestra en la tabla 4.1, figura 4.1 y figura 7.5 (Apéndice A)

Tabla 4.1. Reporte de resultados obtenido de evaluación de muestras seleccionadas para estudio.

| Código de Muestra | Resultado de Muestras Naturales | | Promedio Resultado Muestras Naturales UFC/g | Analista |
|-------------------|---------------------------------|-----|---|----------|
| | UFC/g | | | |
| MHC-01 | <10 | <10 | <10 | A2 |
| MHC-02 | <10 | <10 | <10 | A2 |
| MHC-03 | <10 | <10 | <10 | A2 |
| MHC-04 | <10 | <10 | <10 | A2 |
| MHC-05 | <10 | <10 | <10 | A2 |
| MHC-06 | <10 | <10 | <10 | A2 |
| MHC-07 | <10 | <10 | <10 | A2 |
| MHC-08 | <10 | <10 | <10 | A2 |
| MHC-09 | <10 | <10 | <10 | A2 |
| MHC-10 | <10 | <10 | <10 | A2 |
| MHC-11 | <10 | <10 | <10 | A2 |
| MHC-12 | <10 | <10 | <10 | A2 |

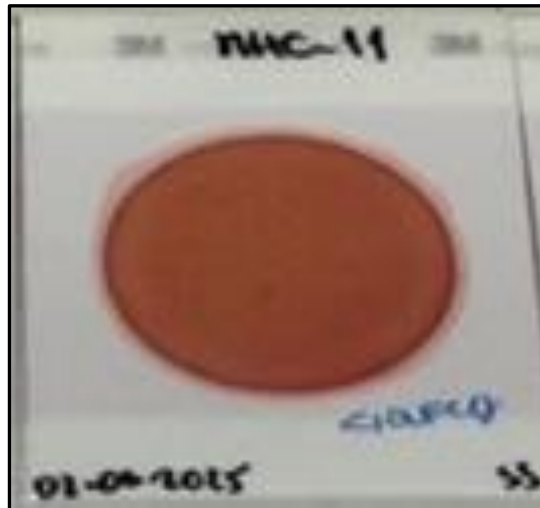


Figura 4.1. Resultados de verificación de contaminación de muestra seleccionadas

4.2.1 Inclusividad y exclusividad

La inclusividad del método fue evaluada mediante el análisis de cepas pertenecientes al grupo objetivo de coliformes totales, seleccionadas de acuerdo con los criterios establecidos en la metodología. Los resultados evidenciaron que el método fue capaz de detectar de manera consistente las cepas objetivo, *Escherichia coli* y *Klebsiella aerogenes* reportados en la tabla 4.2 y observados en la figura 4.2, figura 4.3 y figura 7.6 (Apéndice A), el desarrollo de colonias características en las placas Petrifilm™, sin interferencias atribuibles a la matriz harina de camarón.

Tabla 4 2. Reporte de resultados obtenido de cepas objetivos sembradas en placa petrifilm.

| ITEM | CEPA | RESULTADO TEORICO >10 UFC/g | RESULTADO EXPERIMENTAL UFC/g | RESULTADO PROMEDIO EXPERIMENTAL UFC/g | OBJETIVO UFC/g | ESTADO | ANALISTA |
|------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------------|--------|----------|
| 1 | <i>Escherichia coli</i> | 10 | 145 | 165 | >10 | CUMPLE | A1 |
| | | | 185 | | | | A2 |
| 2 | <i>Klebsiella aerogenes</i> | 10 | 230 | 177,5 | >10 | CUMPLE | A1 |
| | | | 125 | | | | A2 |

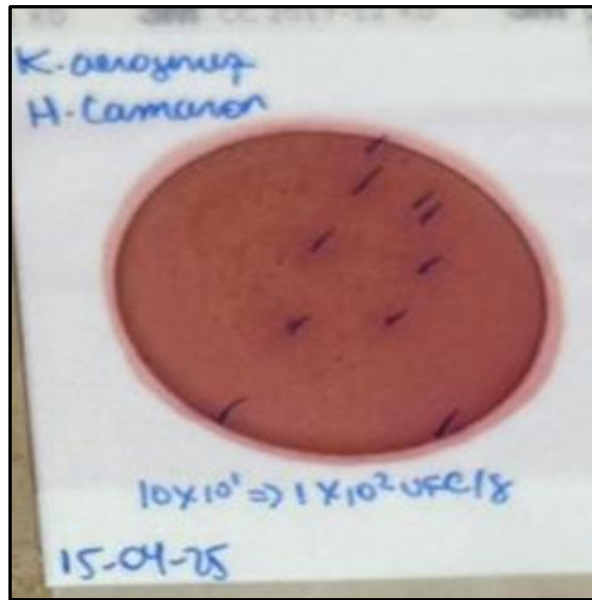


Figura 4.2. Resultados *Klebsiella aerogenes* en placas Petrifilm CC.

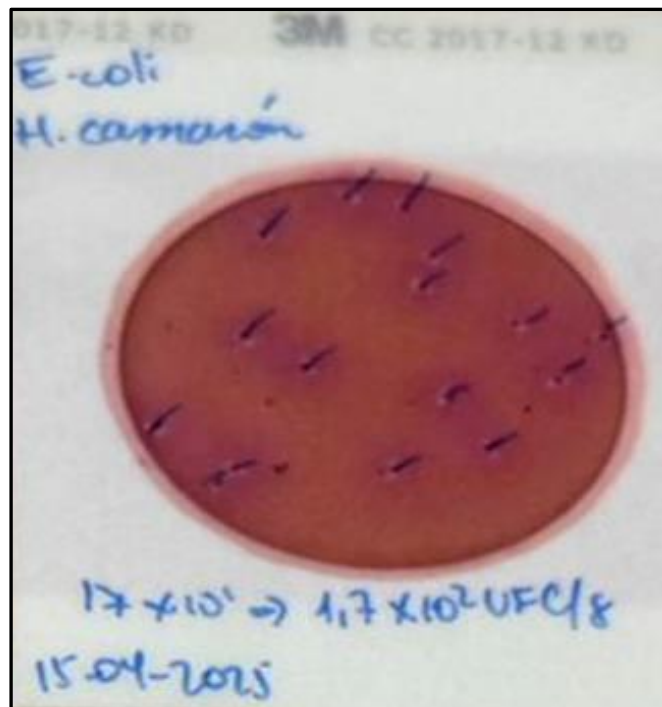


Figura 4.3. Resultados *Escherichia coli* en placas Petrifilm CC.

La exclusividad se determinó utilizando cepas no objetivo, verificándose la ausencia de crecimiento o la no formación de colonias características asociadas a coliformes como muestra la tabla 4.3, figura 4.4 y figura .7.7 (Apéndice A). Estos resultados confirmaron que el método no genera falsos positivos y presenta una adecuada selectividad analítica, incluso en presencia de flora acompañante propia de matrices proteicas complejas.

Tabla 4.3. Reporte de resultados obtenido de cepas no objetivos sembradas en placa petrifilm CC.

| ITEM | CEPA | RESULTADO TEORICO UFC/g | RESULTADO EXPERIMENTAL UFC/g | OBJETIVO UFC/g | ESTADO | ANALISTA |
|------|--|-------------------------|------------------------------|----------------|--------|----------|
| 1 | <i>Listeria monocytogenes</i> (serotype 4e) | <10 | <10 | <10 | CUMPLE | A B |
| 2 | <i>Proteus vulgaris</i> | <10 | <10 | <10 | CUMPLE | A B |
| 3 | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> | <10 | <10 | <10 | CUMPLE | A B |
| 4 | <i>Shigella flexneri</i> (serotype 2b) | <10 | <10 | <10 | CUMPLE | A B |
| 5 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | <10 | <10 | <10 | CUMPLE | A B |
| 6 | <i>Enterococcus faecalis</i> | <10 | <10 | <10 | CUMPLE | A B |
| 7 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <10 | <10 | <10 | CUMPLE | A B |
| 8 | <i>Shigella sonnei</i> | <10 | <10 | <10 | CUMPLE | A B |

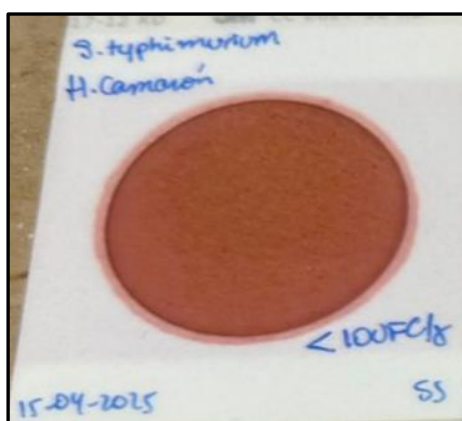


Figura 4.4. Resultados de cepas no objetivos de estudio en placas Petrifilm CC.

Los resultados obtenidos son concordantes con estudios experimentales realizados en matrices diferentes, como agua embotellada, en los cuales se reportó una inclusividad de 47/50 cepas de coliformes con crecimiento típico y una exclusividad de 30/30 cepas no objetivo sin identificación erróneas (A. J. Schumacher et al., 2022)

La concordancia observada respalda que el método Petrifilm™ conserva su capacidad de identificación selectiva del grupo coliforme, incluso cuando se aplica en matrices con características fisicoquímicas distintas a las originalmente evaluadas. Esto demuestra la robustez del método frente a variaciones en la composición de la matriz, incluyendo aquellas de naturaleza seca y con alto contenido proteico. Los resultados comparativos pueden observarse en la Tabla 4.4

Tabla 4 4. Comparación de resultados de inclusividad y exclusividad con otros estudios.

| Característica de desempeño | Resultados de este estudio (Harina de camarón) | Resultados reportados en otros estudios experimentales (Agua embotellada) |
|-----------------------------|--|---|
| Inclusividad | <i>Escherichia coli</i> : 165 UFC/g <i>Klebsiella aerogenes</i> : 178 UFC/g | Inclusividad 47/50 cepas coliformes con crecimiento típico en placas Petrifilm CC |
| Exclusividad | Cepas no objetivo (<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>): <10 UFC/g | Exclusividad 30/30 cepas no objetivo sin identificación errónea como coliformes |

4.2.2 Precisión

La precisión del método se evaluó de 2 formas:

- ✓ Por la verificación de la implementación en términos de desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio, mediante el análisis de réplicas en diferentes niveles de contaminación y en distintos lotes de harina de camarón. Los resultados obtenidos fueron expresados en log₁₀ UFC/g y analizados estadísticamente para estimar la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR}) como muestra la tabla 4.5

Tabla 4.5. Calculo de la desviación estándar intralaboratorio (S_{IR}).

| Código de Muestra | Log ₁₀ resultado A $y_{IA} = \log_{10}(X_{IA})$ | Log ₁₀ resultado B $y_{IB} = \log_{10}(X_{IB})$ | Diferencia absoluta $ y_{IA} - y_{IB} $ | Diferencia al cuadrado $(y_{IA} - y_{IB})^2$ |
|----------------------------|---|---|--|---|
| MHC-01 | 1,698 | 1,544 | 0,155 | 0,024 |
| MHC-02 | 2,204 | 2,190 | 0,014 | 0,0002 |
| MHC-03 | 2,130 | 2,190 | 0,059 | 0,004 |
| MHC-04 | 2,342 | 2,060 | 0,281 | 0,079 |
| MHC-05 | 2,380 | 2,301 | 0,079 | 0,006 |
| MHC-06 | 3,064 | 2,922 | 0,142 | 0,020 |
| MHC-07 | 3,041 | 2,939 | 0,109 | 0,012 |
| MHC-08 | 3,152 | 3,176 | 0,024 | 0,0006 |
| MHC-09 | 3,363 | 3,394 | 0,031 | 0,0009 |
| MHC-10 | 3,429 | 3,432 | 0,002 | 5,83217E-06 |
| MHC-11 | 3,332 | 3,439 | 0,107 | 0,011 |
| MHC-12 | 3,542 | 3,468 | 0,073 | 0,005 |
| Suma | | | | 0,164 |
| Suma/(2*n) | | | | 0,985 |
| S_{IR} | | | | 0,992 |
| n= 12 | | | | |

Los valores de S_{IR} obtenidos se encontraron dentro de los límites aceptables ver tabla 4.6; figura 4.5; figura 4.6 y figura 7.8 y figura 7.9 (Apéndice A); establecidos por la norma ISO 16140-3, lo que evidencia una variabilidad controlada del método bajo las condiciones operativas del laboratorio. Esto demuestra que el método presenta una adecuada consistencia y estabilidad en la generación de resultados, aun considerando la variabilidad inherente a la matriz estudiada.

Tabla 4.6. Calculo para verificación de cumplimiento en la verificación de la implementación.

| SIR | 2*SR (SR ver tabla 4.7 valor medio de tres inoculaciones en harina de nueces) | Criterio de aceptabilidad | Cumplimiento |
|-------|---|------------------------------|--------------|
| 0,992 | 1,315 (2*0,658) | $S_{IR} \leq 2xS_R$ | SI CUMPLE |

Tabla 4.7. Resultados del estudio interlaboratorio (SR) para Coliformes total y E.coli en placas de recuento de película seca. Referencia AOAC 991.14 (tabla 991.14)

| Artículo (alimentario) | Nivel bajo de inoculación | Nivel medio de inoculación | Nivel Alto de inoculación | Valores medios de tres niveles de inoculación |
|------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---|
| Pavo molido | 0,296 | 0,361 | 0,270 | 0,309 |
| Champiñonez frescos | 0,808 | 1,141 | 0,872 | 0,940 |
| Carne de res con salsa | 0,288 | 0,391 | 0,320 | 0,333 |
| Queso | 0,172 | 0,206 | 0,364 | 0,247 |
| Harina de trigo | 0,874 | 1,291 | 1,550 | 1,238 |
| Harina de nueces | 0,443 | 0,699 | 0,831 | 0,658 |

NOTA: Ver tabla completa de referencia en el anexo B

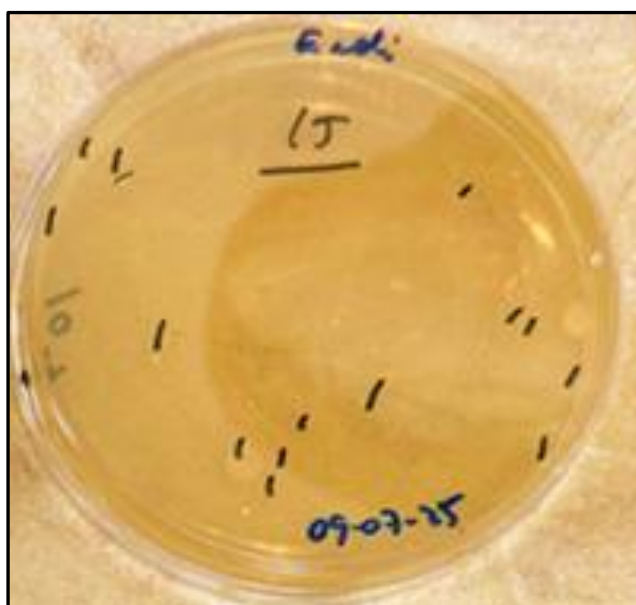


Figura 4.5. Siembra de la concentración del inóculo $1,5 \times 10^8$ UFC/ml



Figura 4.6. Fotos de siembra

- ✓ Se evaluó la precisión intermedia de los 3 niveles (A, B y C) entre analistas para determinar si existe variación significativa de sus datos; mediante ecuaciones y cálculos de ANOVA presentadas en la tabla 7.1- 7.15 (Apéndice A); obteniendo los siguientes resultados ver tabla 4.8 realizando las pruebas F, donde la comparar el valor F calculado de para k-1 y n-k grados de libertad a un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

Bajo este criterio si $F > F_{\text{crítico}}$: Existen diferencias significativas entre las medias de los analistas, indicando que los datos no son lineales; en caso contrarios las diferencias entre las medias de los analistas no son significativas, y los datos son lineales.

Tabla 4.8. Resultados de diferencias significativas entre analistas de los niveles estudiados.

| Nivel | F | Valor crítico para F | Diferencia significativa entre analistas |
|-------|------------|----------------------|--|
| A | 0,371 | 4,413 | No hay diferencia significativa |
| B | 0,006 | 4,413 | No hay diferencia significativa |
| C | 2,1875E-15 | 4,747 | No hay diferencia significativa |

Este estudio permitió evaluar el porcentaje de reproducibilidad y el porcentaje de recuperación que nos permitirán establecer los criterios de aceptación o rechazo de un resultado de análisis, para aplicarlo como aseguramiento en la validez de los resultados.

Los resultados del estudio son consistentes con estudios experimentales desarrollados en matrices cárnicas, donde reportaron coeficientes de correlación entre 0,81 y 0,96 al comparar el método Petrifilm™ con métodos convencionales para el recuento de coliformes, evidenciando una variabilidad aceptable incluso en matrices complejas como en el estudio de carne molida. La concordancia observada respalda la estabilidad del método AOAC 991.14 cuando es aplicado bajo condiciones operativas estandarizadas. (Ho Park et al., 2001; Linton et al., 1997).

La tabla 4.9 muestra la comparación de resultados de % de CV, la desviación estándar intralaboratorio (SIR) y precisión intermedia entre analistas.

Tabla 4.9. Comparación de resultados de % de CV, la desviación estándar intralaboratorio (SIR) y precisión intermedia entre analistas.

| Característica de desempeño | Resultados de este estudio (Harina de camarón) | Resultados reportados en otros estudios experimentales |
|--|---|---|
| Precisión (%RSDIR o %CV) | 12,18 % | Alta concordancia entre Petrifilm y métodos convencionales; coeficientes de correlación %CV = 0,81–0,96 en matrices cárnicas |
| Desviación estándar intralaboratorio (SIR) | 0,993, con criterio $0,993 < 2 \cdot SR (1,315)$ | Variabilidad controlada y reproducibilidad aceptable en estudios comparativos de coliformes |
| Precisión intermedia (ANOVA) | Sin diferencias significativas entre analistas ($F_{calculada} < F_{crítico}$ en niveles A, B y C) | No se observaron diferencias significativas entre métodos o analistas en estudios con carne molida |

4.2.3 Exactitud

La exactitud del método fue evaluada de 2 maneras:

- ✓ Mediante ensayos de contaminación artificial en la matriz harina de camarón, comparando los resultados obtenidos con los valores teóricos del inóculo. El sesgo fue expresado como desviación estimada (eBias) en escala \log_{10} , de acuerdo con lo establecido en la metodología.

Los resultados que se presentan en la tabla 4.10, figura 4.7, 4.8 y 4.9 y figura 7.10, figura 7.11 y figura 7.12 (Apéndice A) demostraron que el sesgo del método se mantuvo dentro de los rangos de aceptación establecidos por la ISO 16140-3, indicando que el método no presenta sobreestimación ni subestimación significativa de los recuentos de coliformes totales. Esto confirma que la matriz harina de camarón no introduce interferencias relevantes que afecten la veracidad del método cuando se aplica bajo las condiciones evaluadas.

Tabla 4.10. Resultados de siembra en UFC/g para evaluación de eBIAS.

| Código de Muestra | Resultado Muestras Naturales UFC/g | Resultado de matriz contaminada artificialmente UFC/g | | Resultado medio de matriz contaminada artificialmente UFC/g | Resultado de la suspensión del inóculo sin alimento matriz UFC/ml | | Resultado medio de la suspensión del inóculo sin alimento matriz UFC/ml |
|-------------------|------------------------------------|---|--------|---|---|--------|---|
| | | | | | | | |
| MHC-01-A | <10 | 100000 | 124000 | 117000 | 145000 | 140000 | 142500 |
| MHC-01-B | | 113000 | 131000 | | | | |
| MHC-07-A | <10 | 1350 | 1320 | 1280 | 1390 | 1380 | 1385 |
| MHC-07-B | | 1290 | 1160 | | | | |
| MHC-10-A | <10 | 120 | 170 | 133 | 150 | 150 | 150 |
| MHC-10-B | | 140 | 100 | | | | |

Tabla 4.11. Resultados de siembra en \log_{10} para evaluación de eBIAS.

| Código de Muestra | Resultado de matriz contaminada artificialmente \log_{10} UFC/g | Resultado de la suspensión del inóculo sin alimento matriz \log_{10} UFC/ml | eBias: diferencia absoluta entre el resultado de matriz contaminada y la suspensión del inóculo | Cumplimiento de diferencia absoluta $\leq 0,5 \log_{10}$ |
|-------------------|---|---|---|--|
| MHC-01-A | 5,07 | 5,15 | 0,09 | CUMPLE |
| MHC-01-B | | | | |
| MHC-07-A | 3,11 | 3,14 | 0,03 | CUMPLE |
| MHC-07-B | | | | |
| MHC-10-A | 2,12 | 2,18 | 0,05 | CUMPLE |
| MHC-10-B | | | | |

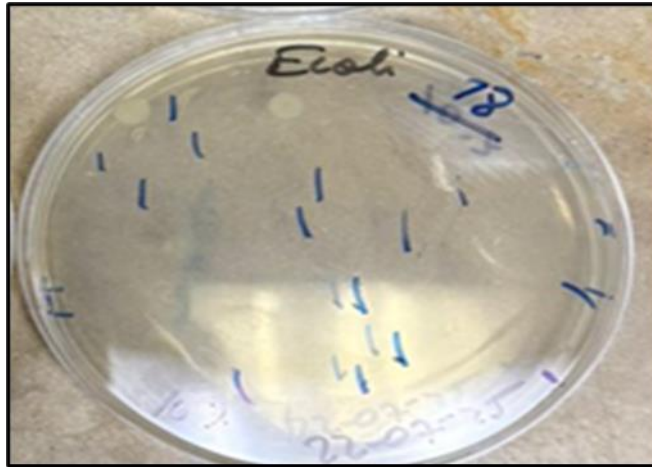


Figura 4.7. Siembra de la concentración del inóculo $1,8 \times 10^8$ UFC/ml

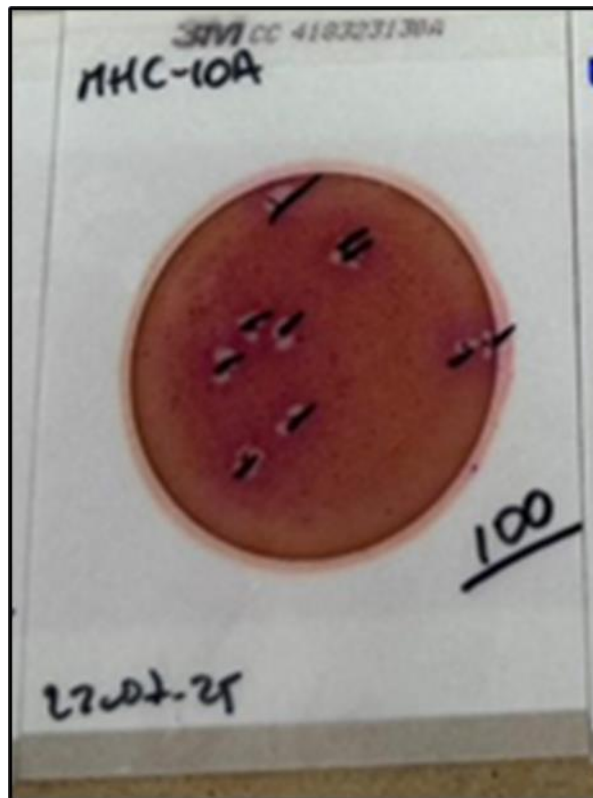


Figura 4.8. Resultado de siembra del inóculo.

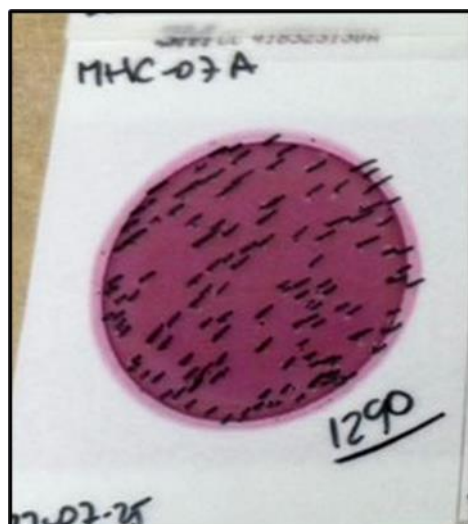


Figura 4.9. Resultado de siembra de muestra más inoculo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son consistentes con antecedentes experimentales reportados en la literatura. Diversos autores han descrito diferencias menores a $\pm 0,5 \log_{10}$ entre el método Petrifilm™ CC y los métodos de referencia en evaluaciones realizadas en agua embotellada. Asimismo, se ha señalado que, en matrices cárnicas, el sistema Petrifilm™ puede alcanzar recuperaciones equivalentes o incluso superiores a las obtenidas con medios tradicionales, lo cual se atribuye a una mayor eficiencia en la recuperación de coliformes en matrices complejas.

Estos antecedentes respaldan la exactitud observada en esta investigación y confirman el desempeño adecuado del método bajo las condiciones evaluadas (Restaino & Lyon, 1987; A. J. Schumacher et al., 2022b).

En la Tabla 4.12 se presenta la comparación detallada entre los estudios referenciados y los resultados obtenidos

Tabla 4.12. Resultados del estudio comparado con otros estudios.

| Característica de desempeño | Resultados de este estudio (Harina de camarón) | Resultados reportados en otros estudios experimentales |
|------------------------------------|---|---|
| Exactitud (eBias) | 0,14–0,22 \log_{10} | Diferencias de medias $< \pm 0,5 \log_{10}$ entre Petrifilm y métodos de referencia (agua embotellada) |
| Exactitud (%Recuperación) | 84,75–98,37 % | Recuperaciones aceptables; Petrifilm puede recuperar incluso mayor número de coliformes que VRBA en matrices complejas (matrices cárnicas) |

4.2.4 Incertidumbre de medición

La incertidumbre de medición fue estimada considerando la incertidumbre técnica, incertidumbre de la matriz y la incertidumbre por distribución, según conformidad con los lineamientos de la norma ISO 19036:2020.

Los datos resultantes obtenidos en el cálculo de incertidumbre técnica serán mostrados en la tabla 4.13 y figura 7.13 y figura 7.14 y en la figura 4.10 y figura 4.11

Tabla 4.13. Resultados de evaluación de la incertidumbre técnica (desviación estándar intralaboratorio).

| Identificación Muestra | Muestra de Laboratorio | Porción de ensayo | Media Ponderada del resultado del recuento de colonias en ufc/g | \log_{10} ufc/g | Diferencia \log_{10} ufc/g | Cuadrado de la diferencia $(y1A-y1B)^2$ | Analista |
|------------------------|------------------------|-------------------|---|----------------------------|------------------------------|---|----------|
| | i | j | Xij | $y_{ij}=\log_{10}(x_{ij})$ | y1A-y1B | $(y1A-y1B)^2$ | |
| MHC 1 | 1 | A | 7,182E+04 | 4,8562 | 0,0226 | 0,0005 | A1 |
| | 1 | B | 6,818E+04 | 4,8337 | | | A2 |
| MHC 2 | 2 | A | 5,182E+03 | 3,7145 | -0,0637 | 0,0041 | A1 |
| | 2 | B | 6,000E+03 | 3,7782 | | | A2 |
| MHC 3 | 3 | A | 4,727E+04 | 4,6746 | 0,0628 | 0,0039 | A1 |
| | 3 | B | 4,091E+04 | 4,6118 | | | A2 |
| MHC 4 | 4 | A | 1,009E+04 | 4,0039 | 0,0410 | 0,0017 | A1 |
| | 4 | B | 9,182E+03 | 3,9629 | | | A2 |
| MHC 5 | 5 | A | 1,109E+03 | 3,0450 | -0,0926 | 0,0086 | A1 |
| | 5 | B | 1,373E+03 | 3,1376 | | | A2 |
| MHC 6 | 6 | A | 6,636E+02 | 2,8219 | -0,0957 | 0,0092 | A1 |
| | 6 | B | 8,273E+02 | 2,9176 | | | A2 |
| MHC 7 | 7 | A | 3,000E+02 | 2,4771 | 0,0272 | 0,0007 | A1 |
| | 7 | B | 2,818E+02 | 2,4500 | | | A2 |
| MHC 8 | 8 | A | 2,818E+02 | 2,4500 | -0,0884 | 0,0078 | A1 |
| | 8 | B | 3,455E+02 | 2,5384 | | | A2 |
| MHC 9 | 9 | A | 4,364E+02 | 2,6398 | 0,0000 | 0,0000 | A1 |
| | 9 | B | 4,364E+02 | 2,6398 | | | A2 |
| MHC 10 | 10 | A | 7,636E+02 | 2,8829 | 0,0105 | 0,0001 | A1 |
| | 10 | B | 7,455E+02 | 2,8724 | | | A2 |
| Suma | | | | | | 0,037 | n=10 |
| Suma/(2*n) | | | | | | 0,002 | |
| S_{IR} | | | | | | 0,043 | |

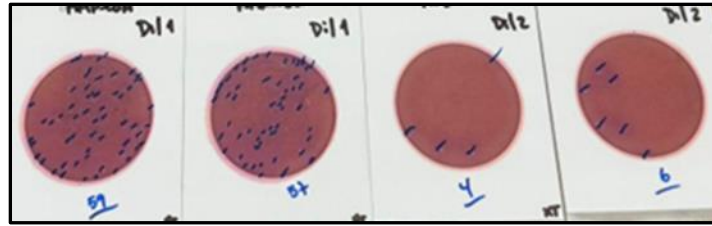


Figura 4.10. Resultado de siembra de porción A

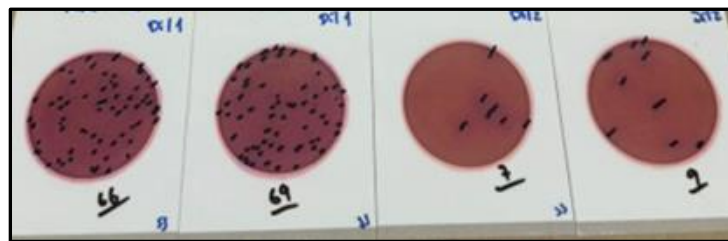


Figura 4.11. Resultado de siembra de porción B

Los datos resultantes obtenidos en el cálculo de incertidumbre matriz serán mostrados en la tabla 4.14 y tabla 4.15, figura 7.15 y en la figura 4.12 y figura 4.13

Tabla 4.14. Resultados de datos de siembra para incertidumbre matriz

| Identificación Muestra | Porción de ensayo | Réplicas | Factores de dilución (d) Colonia contadas C | | | | Total de Colonias contadas ΣC_{ij} | Media Ponderada del resultado del recuento de colonias en ufc/g |
|------------------------|-------------------|----------|--|-------|-------|-------|---|---|
| | | | d_1 | C_1 | d_2 | C_2 | | X_{ij} |
| MHP 13 | 1 | A | 1 | 116 | 2 | 20 | 136 | 1,2E+03 |
| | 1 | B | 1 | 120 | 2 | 12 | 132 | 1,2E+03 |
| MHP 13 | 2 | A | 2 | 33 | 3 | 3 | 36 | 3,3E+03 |
| | 2 | B | 2 | 32 | 3 | 3 | 35 | 3,2E+03 |
| | 2 | C | 2 | 31 | 3 | 1 | 32 | 2,9E+03 |
| MHP 13 | 3 | A | 1 | 74 | 2 | 18 | 92 | 8,4E+02 |
| | 3 | B | 1 | 75 | 2 | 5 | 80 | 7,3E+02 |
| MHP 13 | 4 | A | 2 | 40 | 3 | 7 | 47 | 4,3E+03 |
| | 4 | B | 2 | 56 | 3 | 1 | 57 | 5,2E+03 |
| | 4 | C | 2 | 50 | 3 | 5 | 55 | 5,0E+03 |
| MHP 13 | 5 | A | 1 | 50 | 2 | 4 | 54 | 4,9E+02 |
| | 5 | B | 1 | 55 | 2 | 5 | 60 | 5,5E+02 |
| MHP 13 | 6 | A | 2 | 47 | 3 | 4 | 51 | 4,6E+03 |
| | 6 | B | 2 | 59 | 3 | 6 | 65 | 5,9E+03 |
| | 6 | C | 2 | 40 | 3 | 3 | 43 | 3,9E+03 |

| | | | | | | | | |
|--------|----|---|---|-----|---|----|-----|---------|
| MHP 13 | 7 | A | 1 | 113 | 2 | 18 | 131 | 1,2E+03 |
| | 7 | B | 1 | 115 | 2 | 20 | 135 | 1,2E+03 |
| MHP 13 | 8 | A | 2 | 31 | 3 | 6 | 37 | 3,4E+03 |
| | 8 | B | 2 | 48 | 3 | 2 | 50 | 4,5E+03 |
| MHP 13 | 9 | A | 1 | 58 | 2 | 3 | 61 | 5,5E+02 |
| | 9 | B | 1 | 70 | 2 | 5 | 75 | 6,8E+02 |
| MHP 13 | 10 | A | 2 | 42 | 3 | 2 | 44 | 4,0E+03 |
| | 10 | B | 2 | 49 | 3 | 5 | 54 | 4,9E+03 |
| | 10 | C | 2 | 45 | 3 | 2 | 47 | 4,3E+03 |
| MHP 13 | 11 | A | 1 | 46 | 2 | 5 | 51 | 4,6E+02 |
| | 11 | B | 1 | 53 | 2 | 4 | 57 | 5,2E+02 |

Tabla 4.15 Resultados de evaluación de la incertidumbre matriz

| Identificación Muestra | Porción de ensayo | Réplicas | log ₁₀ ufc/g y _{ij} =log ₁₀ (x _{ij}) | Recuento medio log 10 | Cuadrado de las diferencias respecto a la media | Grados de libertad |
|------------------------|-------------------|----------|--|-----------------------|---|--------------------|
| | | | | | | n-1 |
| MHP 13 | 1 | A | 3,092 | 3,086 | 0,00004 | 1 |
| | 1 | B | 3,079 | | 0,00004 | |
| MHP 13 | 2 | A | 3,515 | 3,494 | 0,00045 | 2 |
| | 2 | B | 3,503 | | 0,00008 | |
| | 2 | C | 3,464 | | 0,00090 | |
| MHP 13 | 3 | A | 2,922 | 2,892 | 0,00092 | 1 |
| | 3 | B | 2,862 | | 0,00092 | |
| MHP 13 | 4 | A | 3,631 | 3,681 | 0,00257 | 2 |
| | 4 | B | 3,714 | | 0,00110 | |
| | 4 | C | 3,699 | | 0,00031 | |
| MHP 13 | 5 | A | 2,691 | 2,714 | 0,00052 | 1 |
| | 5 | B | 2,737 | | 0,00052 | |
| MHP 13 | 6 | A | 3,666 | 3,677 | 0,00011 | 2 |
| | 6 | B | 3,772 | | 0,00901 | |
| | 6 | C | 3,592 | | 0,00714 | |
| MHP 13 | 7 | A | 3,076 | 3,082 | 0,00004 | 1 |
| | 7 | B | 3,089 | | 0,00004 | |
| MHP 13 | 8 | A | 3,527 | 3,592 | 0,00428 | 1 |
| | 8 | B | 3,658 | | 0,00428 | |
| MHP 13 | 9 | A | 2,744 | 2,789 | 0,00201 | 1 |
| | 9 | B | 2,834 | | 0,00201 | |
| MHP 13 | 10 | A | 3,602 | 3,641 | 0,00154 | 2 |
| | 10 | B | 3,691 | | 0,00247 | |
| | 10 | C | 3,631 | | 0,00011 | |
| MHP 13 | 11 | A | 2,666 | 2,690 | 0,00058 | 1 |
| | 11 | B | 2,714 | | 0,00058 | |
| Suma | | | | | 0,043 | 15 |
| Suma/(n) | | | | | 0,003 | |
| S _{IR} | | | | | 0,053 | |

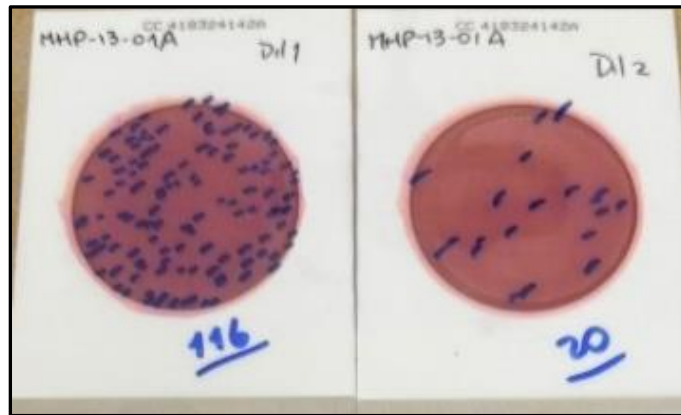


Figura 4.12. Resultado de siembra de porción A para U_{matriz} .

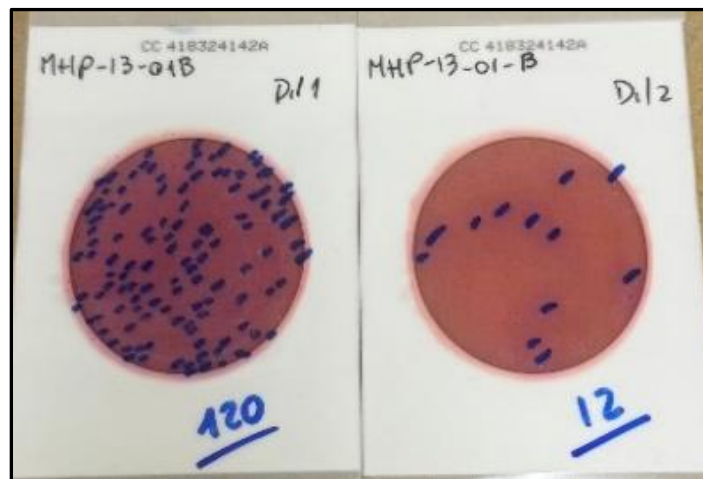


Figura 4.13. Resultado de siembra de porción B para U_{matriz} .

Los datos resultantes obtenidos en el cálculo de incertidumbre de distribución ($U_{poisson}$) serán mostrados en la tabla 4.16 y en la figura 4.14

Tabla 4.16. Resultados de evaluación de la incertidumbre distribución ($U_{poisson}$).

| Porción de ensayo | Factores de dilución (d) Colonia contadas C | | | | Total de Colonias contadas | ANALISTA | (Incertidumbre de Poisson) $U_{poisson}$ |
|-------------------|--|-------|-------|-------|----------------------------|----------|---|
| | d_1 | C_1 | d_2 | C_2 | ΣC | | |
| 1 | 3 | 73 | 4 | 6 | 79 | A1 | 0,049 |

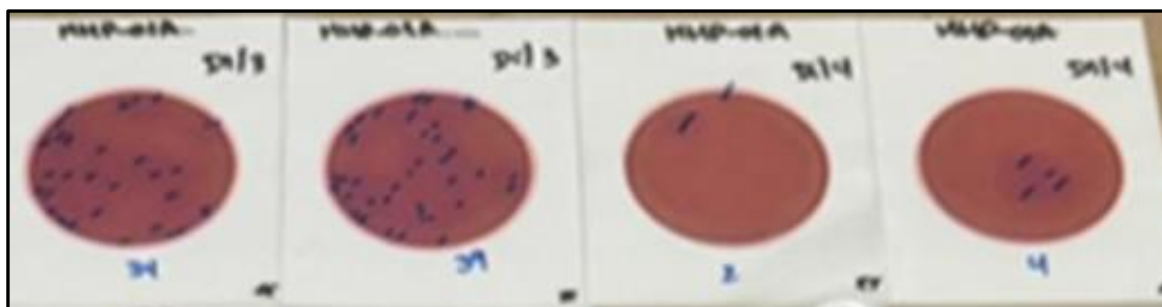


Figura 4.14. Resultado de siembra incertidumbre de poisson.

La incertidumbre típica combinada fue calculada a partir de la raíz cuadrada de las sumas de las fuentes incertidumbre al cuadrado como muestra la tabla 4.17, y posteriormente se estimó la incertidumbre expandida utilizando un factor de cobertura $k=2$, correspondiente a un nivel de confianza aproximado del 95 % ver tabla 4.18. Los valores obtenidos se consideran aceptables para un método microbiológico de recuento y adecuados para su aplicación en el control microbiológico de harina de camarón.

Tabla 4.17. Resultados de cálculo de incertidumbre combinada

| COMPONENTES DE INCERTIDUMBRE | INCERTIDUMBRES TÍPICAS | (INCERTIDUMBRES TÍPICAS) ² | Σ (INCERTIDUMBRES TÍPICAS) ² | INCERTIDUMBRE COMBINADA |
|---|------------------------|---------------------------------------|--|-------------------------|
| Incertidumbre Técnica ($U_{\text{técn}}$) | 0,043 | 0,002 | 0,007 | 0,084 |
| Incertidumbre matriz (U_{matriz}) | 0,053 | 0,003 | | |
| Incertidumbre por Distribución (U_{poisson}) | 0,049 | 0,002 | | |

Tabla 4.18. Resultados de cálculo de incertidumbre expandida.

| INCERTIDUMBRE COMBINADA | k (Nivel de confianza 95%) | INCERTIDUMBRE EXPANDIDA (U) | UNIDADES |
|--|----------------------------|-----------------------------|--------------|
| 0,084 | 2 | 0,17 | Log 10 UFC/g |
| Se recomienda que la incertidumbre expandida se redondee a dos cifras significativas utilizando las reglas normales de redondeo de acuerdo con la Norma ISO 7218 | | | |

4.3 Evaluación del LOD y LOQ en la matriz de estudio

La determinación de estos parámetros se realizó mediante el análisis de muestras con bajos niveles de contaminación, obtenidos a partir de diluciones seriadas y ensayos de contaminación artificial en la matriz. Las muestras fueron analizadas como está planteado en la metodología permitiendo evaluar la capacidad del método para detectar y cuantificar coliformes totales en niveles cercanos al límite inferior de trabajo, bajo condiciones reales de aplicación en el laboratorio.

4.3.1 Límite de Detección (LOD)

Fue establecido como la menor concentración de coliformes totales en la cual el método fue capaz de detectar consistentemente la presencia del microorganismo objetivo, con un nivel de confianza aceptable; obteniendo los siguientes resultados ver tabla 4.19, figura 4.15 y figura 7.16

Tabla 4.19. Resultados de siembra de 2 niveles y blanco.

| DATOS ANALITICOS | | | | |
|---------------------------------------|--------------------------|----------------|--|-----------------|
| Identificación Lote de Muestra | Código de Muestra | Niveles | Resultado Muestras Contaminadas UFC/g | Analista |
| HC-133 | MHC-01 | Intermedio | 100 | A1 |
| HC-133 | MHC-01 | Intermedio | 100 | A1 |
| HC-133 | MHC-01 | Intermedio | 100 | A1 |
| HC-133 | MHC-01 | Intermedio | 100 | A1 |
| HC-133 | MHC-01 | Intermedio | 100 | A1 |
| HC-133 | MHC-01 | Bajo | 10 | A1 |
| HC-133 | MHC-01 | Bajo | 10 | A1 |
| HC-133 | MHC-01 | Bajo | 10 | A1 |
| HC-133 | MHC-01 | Bajo | 10 | A1 |
| HC-133 | MHC-01 | Bajo | 10 | A1 |
| HC-133 | MHC-01 | Blanco | 0 | A1 |
| HC-133 | MHC-01 | Blanco | 0 | A1 |
| HC-133 | MHC-01 | Blanco | 0 | A1 |
| HC-133 | MHC-01 | Blanco | 0 | A1 |
| HC-133 | MHC-01 | Blanco | 0 | A1 |

La tabla 4.20 muestra la comparación de resultado de LOD y LOQ con estudios de otras matrices

Tabla 4.20. Comparación del resultado LOD y LOQ de estudio con otras matrices en estudio.

| Característica de desempeño | Resultados de este estudio (Harina de camarón) | Resultados reportados en otros estudios experimentales (Matrices acuosas y semisólidas) |
|------------------------------------|---|--|
| Límite de Detección (LOD) | 10 UFC/g | Detección cercana a 1 colonia/placa en matrices acuosas y semisólidas cuando existe adecuada homogeneización |
| Límite de Cuantificación (LOQ) | 10 UFC/g | Cuantificación confiable desde el nivel más bajo de inoculación evaluado en validaciones AOAC 991.14 |

4.4 Evaluación integral del método AOAC 991.14

A partir de los resultados obtenidos en la evaluación de las características de desempeño analítico y en la determinación de los límites de detección y cuantificación, se determinó la validez de la metodología AOAC 991.14 mediante placas Petrifilm™ para el recuento de coliformes totales en la matriz harina de camarón, bajo las condiciones específicas del laboratorio evaluado.

La validez del método se sustentó en el cumplimiento de los criterios establecidos por la norma ISO 16140-3:2021 para la verificación de métodos alternativos por parte del laboratorio usuario. En este sentido, los resultados demostraron que el método presenta una adecuada selectividad, evidenciada por su capacidad para detectar de manera consistente los microorganismos objetivo (inclusividad) y excluir microorganismos no objetivo (exclusividad), sin interferencias atribuibles a la flora acompañante ni a la composición de la matriz.

Asimismo, la precisión del método, evaluada a través de la reproducibilidad intralaboratorio, mostró una variabilidad controlada y compatible con los valores de referencia establecidos para métodos microbiológicos cuantitativos. Este comportamiento confirma que el método genera resultados consistentes y reproducibles cuando es aplicado bajo condiciones operativas controladas, aun considerando la heterogeneidad de la harina de camarón.

En relación con la exactitud, los ensayos de contaminación artificial evidenciaron que el sesgo del método se mantuvo dentro de los límites de aceptación establecidos, lo que indica que la metodología AOAC 991.14 no presenta desviaciones sistemáticas significativas en la estimación del recuento de coliformes totales. Esto demuestra que la matriz harina de camarón no afecta de manera relevante la veracidad de los resultados cuando el método es correctamente implementado.

Por otra parte, los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) determinados mediante ensayos analíticos confirmaron que el método posee una sensibilidad adecuada para detectar y cuantificar coliformes totales en niveles bajos, permitiendo su aplicación efectiva como herramienta de control microbiológico. La definición clara de estos límites garantiza una correcta interpretación de los resultados, especialmente en situaciones cercanas al umbral de aceptación microbiológica.

En resumen, la evidencia experimental obtenida permite concluir que la metodología AOAC 991.14 mediante placas Petrifilm™ es válida y apta para su aplicación en el recuento de coliformes totales en harina de camarón, en el contexto de una verificación intralaboratorial. El método cumple con los criterios de desempeño analítico establecidos en los objetivos de validación referenciadas en las normas internacionales aplicables y puede ser incorporado de manera confiable dentro del alcance analítico del laboratorio para el control microbiológico de esta matriz, ver tabla 4.21.

Tabla 4.21. Evaluación del cumplimiento de los objetivos de validación.

| Característica de Desempeño | Objetivos de validación (Criterios de aceptabilidad) | Resultados obtenidos | | Estado de cumplimiento Conclusión |
|--------------------------------|--|--|--------------|---|
| Inclusividad | Cepas estudiadas >10 UFC/g | <i>Escherichia coli</i> | 165 UFC/g | Cumple Método de placas petrifilm para coliformes totales, identifica la cepa de objetivo de estudio |
| | | <i>Klebsiella aerogenes</i> | 178 UFC/g | |
| Exclusividad | Cepas estudiadas <10 UFC/g | <i>Listeria monocytogenes (serotype 4e)</i> | <10 UFC/g | Cumple Método de placas petrifilm para coliformes totales, no identifica la cepa de objetivo de estudio |
| | | <i>Proteus vulgaris</i> | <10 UFC/g | |
| | | <i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium</i> | <10 UFC/g | |
| | | <i>Shigella flexneri (serotype 2b)</i> | <10 UFC/g | |
| | | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | <10 UFC/g | |
| | | <i>Enterococcus faecalis</i> | <10 UFC/g | |
| | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <10 UFC/g | |
| | | <i>Shigella sonnei</i> | <10 UFC/g | |
| Límite de Detección (LOD) | >10 UFC/g | 10 UFC/g | | Cumple Se demostró la mínima detección de las placas petrifilm para coliformes totales |
| Límite de Cuantificación (LOQ) | >10 UFC/g | 10 UFC/g | | Cumple Se demostró que el método es cuantificable en el nivel más bajo |
| | Reproducibilidad %RSDIR o %CV ≤ 49,5 | 12,18 % | | |
| | % Recuperación 70-130% | 84,75 % | | |

| | | | | |
|---|---|--------------------------|--------------|--|
| Precisión: SIR (Desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio) | SIR <2*la desviación estándar de la reproducibilidad entre laboratorios (SR=0,658) 2*0,658=1,315 | 0,993 0,993<1,315 | | Cumple Aceptado en la verificación de la implementación. |
| Precisión Intermedia ANOVA para reproducibilidad intralaboratorio | %RSDIR o %CV Porcentaje debe ser ≤49.5% | Nivel A | 0,77 | Cumple Se acepta y se establece como una condición de aseguramiento de calidad |
| | | Nivel B | 8,82 | |
| | | Nivel C | 12,18 | |
| ANOVA para reproducibilidad intralaboratorio entre analistas. | F(calculada) < Fcrítico No hay diferencia significativa Fcritico Nivel A: 4,414 Fcritico Nivel B: 4,414 Fcritico Nivel C: 4,747 | Nivel A | 0,37005 | Cumple La variabilidad está dentro de los límites aceptables, precisión adecuada entre analistas. No hay diferencia significativa en ningún nivel |
| | | Nivel B | 0,0069 | |
| | | Nivel C | 2,187466E-15 | |
| Exactitud: Verificación del producto: eBias (Desviación estándar estimada) | Log10 ufc/ml (inoculo)-promedio log10 ufc/porción para análisis contaminado artificialmente ≤ 0,5 log10 para cada uno de los niveles de inoculación. | Nivel 1 | 0,14 | Cumple Se acepta la verificación de la matriz en estudio. |
| | | Nivel 2 | 0,14 | |
| | | Nivel 3 | 0,22 | |
| Exactitud: veracidad %Recuperación | 70-130% | Nivel A | 98,37% | Cumple Se acepta y se establece como una condición de aseguramiento de calidad |
| | | Nivel B | 89,51% | |
| | | Nivel C | 84,75% | |
| Incertidumbre | ≤0.5 log ₁₀ | 0,17 log ₁₀ | | Se acepta el valor de incertidumbre en log ₁₀ |

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Se estructuró un protocolo técnico robusto para verificar AOAC 991.14 (Petrifilm™) en harina de camarón, alineado con ISO 16140-3:2021 e ISO/IEC 17025:2017, definiendo claramente características de desempeño, objetivos de calidad y criterios de aceptación, considerando parámetros como selectividad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación, e incertidumbre de medición. El diseño experimental incluyó replicación, controles positivos/negativo, y el control sistemático de variables críticas del proceso analítico, tales como la homogeneización de la muestra, el diluyente empleado, las condiciones de incubación y la lectura de resultados. En conjunto, estos elementos permitieron demostrar que el método puede aplicarse de manera confiable, trazable y reproducible en la matriz estudiada, respaldando su uso rutinario dentro del sistema de gestión del laboratorio.
- El método demostró un desempeño analítico adecuado en la matriz harina de camarón. En términos de selectividad, presentó inclusividad satisfactoria con detección consistente de *Escherichia coli* (165 UFC/g) y *Klebsiella aerogenes* (178 UFC/g), superando el criterio establecido (>10 UFC/g), y adecuada exclusividad al no evidenciar falsos positivos frente a ocho cepas no objetivo (<10 UFC/g). En relación con la precisión intralaboratorio, el método mostró un valor de SIR de 0,993, inferior al criterio de aceptación ($2 \cdot SR = 1,315$), y un coeficiente de variación global aproximado de 12,18%, significativamente menor al límite permitido (49,5%), lo que indica baja dispersión y adecuada repetibilidad. Asimismo, el análisis de varianza no evidenció diferencias estadísticamente significativas entre analistas en los niveles evaluados (A, B y C), confirmando la consistencia del desempeño bajo condiciones operativas normales del laboratorio. Respecto a la exactitud, los valores de eBias obtenidos (0,14–0,22 \log_{10}) se mantuvieron dentro del límite aceptable de $\pm 0,5 \log_{10}$, y los porcentajes de recuperación (84,75–98,37%) se ubicaron dentro del rango de aceptación de 70–130%, evidenciando ausencia de sesgo significativo y adecuada veracidad del

método. Finalmente, la incertidumbre de medición, estimada como incertidumbre combinada y expandida ($k=2$) conforme a la ISO 19036:2020, se mantuvo en rangos aceptables para métodos cuantitativos de recuento microbiológico. En conjunto, estos resultados confirmaron la veracidad y confiabilidad del método en la matriz.

- Los límites de desempeño obtenidos confirman que el método presenta la sensibilidad requerida para su aplicación en la matriz evaluada. Se determinó un límite de detección (LOD) de 10 UFC/g y un límite de cuantificación (LOQ) de 10 UFC/g, establecidos mediante inoculación controlada y evaluación de cinco réplicas por nivel (blanco, bajo e intermedio), bajo condiciones reales de operación del laboratorio. Estos valores evidencian que el método es capaz de detectar y cuantificar coliformes en niveles bajos en harina de camarón, lo cual resulta fundamental para el control microbiológico de esta matriz. Además, los resultados son consistentes con lo reportado en validaciones AOAC para el uso de placas Petrifilm™ en matrices secas o semisólidas, respaldando su idoneidad para la aplicación rutinaria dentro del sistema de aseguramiento de la calidad del laboratorio.
- La metodología AOAC 991.14 (Petrifilm™) es válida y apta para su aplicación en harina de camarón bajo las condiciones del laboratorio usuario. El estudio mostró selectividad adecuada, al detectar consistentemente las cepas objetivo *Escherichia coli* (165 UFC/g) y *Klebsiella aerogenes* (178 UFC/g), mientras que no se observaron reacciones positivas frente a ocho cepas no objetivo (<10 UFC/g), confirmando su especificidad. La variabilidad analítica se mantuvo controlada, con un índice de repetibilidad (SIR) de 0,993, inferior al valor crítico establecido ($2 \cdot SR = 1,315$), y un coeficiente de variación global aproximado de 12,18%, sin diferencias estadísticamente significativas entre analistas según el ANOVA realizado. En cuanto a la veracidad, el sesgo estimado ($0,14-0,22 \log_{10}$) y los porcentajes de recuperación obtenidos (84,75–98,37%) se situaron dentro de los criterios de aceptación definidos, evidenciando concordancia con el método de referencia. Asimismo, el límite de detección y cuantificación establecido en 10 UFC/g demuestra que el método posee sensibilidad adecuada para identificar niveles bajos de contaminación en esta matriz. La estimación de la incertidumbre, calculada conforme a ISO 19036, se obtuvo un valor $0,17 \log_{10}$; manteniéndose

dentro de rangos aceptables para métodos de recuento microbiológico, reforzando la confiabilidad de los resultados generados. En conjunto, el método cumple ISO 16140-3 e ISO/IEC 17025 y puede implementarse de forma rutinaria para control microbiológico de esta matriz

5.2 RECOMENDACIONES

- Incorporar el método AOAC 991.14 mediante placas Petrifilm™ dentro del alcance analítico del laboratorio para el análisis rutinario de coliformes totales en harina de camarón, asegurando su aplicación conforme al protocolo de verificación establecido en este estudio.
- Mantener un control periódico del desempeño del método mediante la revisión de parámetros críticos como precisión, exactitud e incertidumbre, especialmente cuando se introduzcan cambios en el personal analista, equipos, lotes de placas o condiciones operativas del laboratorio.
- Evitar extrapolar estos límites a otras matrices sin realizar una verificación adicional, debido a la influencia significativa de la composición de la muestra en la recuperación microbiana.
- Capacitar de manera continua al personal analista en la correcta preparación de la muestra, homogeneización y lectura de placas Petrifilm™, debido a que estos factores influyen directamente en la variabilidad del recuento y en la incertidumbre del resultado.
- Fortalecer la confiabilidad del método en el tiempo, complementando la verificación con ensayos de aptitud interlaboratorio cuando estos se encuentren disponibles para matrices de origen marino o alimentos para alimentación animal.
- Ampliar en futuros estudios la evaluación del método AOAC 991.14 a otras matrices marinas o subproductos de origen acuícola, con el fin de generar mayor evidencia científica sobre su aplicabilidad en matrices complejas poco estudiadas.
- Evaluar comparativamente el método Petrifilm™ con métodos tradicionales de referencia en harina de camarón, lo cual permitiría fortalecer la evidencia técnica y respaldar su equivalencia analítica bajo un enfoque comparativo.
- Utilizar los resultados de este estudio como base técnica para auditorías, procesos de acreditación o ampliación de alcance del laboratorio, ya que el protocolo y los resultados generados cumplen con los requisitos normativos internacionales vigentes.

6. REFERENCIAS

- 3M Company. (2020). 3M Petrifilm™ plates: Technical overview and validation summary.
- Anderson, T., Haggerty, A., Silva, E., Mason, C., Bell, D., & Denholm, K. S. (2024a). Validation of the diagnostic accuracy of the 3M™ Petrifilm™ coliform and aerobic count plates to measure colostrum bacterial contamination on Scottish dairy farms. *The Veterinary Journal*, 308, 106230. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2024.106230>
- Codex Alimentarius Commission. (2024). Code of practice on good animal feeding (CXC 54-2004). FAO/WHO.
- Curiale, M. S., Cieslak, P. R., & Pieretti, J. (1991). Comparison of the Petrifilm coliform count plate method to the standard method for coliform enumeration. *Journal of Food Protection*, 54(7), 524–527. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.7.524>
- Eurachem. (2023). Accreditation for microbiological laboratories (3rd ed.). Eurachem. <https://www.eurachem.org>
- FAO/WHO. (2020). Food safety regulatory framework: Global guidance. FAO/WHO.
- Ho Park, Y., Seo, K. S., Ahn, J. S., Yoo, H. S., & Kim, S. P. (2001). Evaluation of the Petrifilm plate method for the enumeration of aerobic microorganisms and coliforms in retailed meat samples. *Journal of Food Protection*, 64(11), 1841–1846. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.11.1841>
- Huss, H. H. (2019). Quality and quality changes in fresh fish (FAO Fisheries Technical Paper No. 348). FAO. <https://www.fao.org/3/v7180e/v7180e00.htm>
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (2018). *Microorganisms in foods 8: Use of data for assessing process control and product acceptance*. Springer.
- International Organization for Standardization. (2017). ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO.
- International Organization for Standardization. (2016). ISO 16140-1:2016. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 1: Vocabulary. ISO.

- International Organization for Standardization. (2016). ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. ISO.
- International Organization for Standardization. (2019). ISO 19036:2019. Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. ISO.
- International Organization for Standardization. (2021). ISO 16140-3:2021. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. ISO.
- International Organization for Standardization. (2024). ISO 7218:2024. Microbiology of the food chain — General requirements and guidance for microbiological examinations. ISO.
- International Organization for Standardization. (2024). ISO 6887-1:2017/Amd 1:2024. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions. ISO.
- International Organization for Standardization. (2014). ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media. ISO.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., & Uyttendaele, M. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1–2), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.046>
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology* (7th ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/b100840>
- Johnson, N., Chang, Z., Bravo Almeida, C., Michel, M., Iversen, C., & Callanan, M. (2014). Evaluation of indirect impedance for measuring microbial growth in complex food matrices. *Food Microbiology*, 42, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.014>
- Kornacki, J. L., & Gurtler, J. B. (2015). Recovery of injured microorganisms. In M. L. Speck (Ed.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (5th ed., pp. 95–104). American Public Health Association.

- Latimer, G. W., Jr. (2016). *Official methods of analysis of AOAC International* (20th ed.). AOAC International.
- Le, Q. N., Mozola, M., Tudor, A., Horine, L., Roman, B., Montei, C., Zhang, L., Biswas, P., & Donofrio, R. (2022). Validation of the Soleris® coliform method for detection of coliform bacteria in dried cannabis flower: AOAC Performance Tested MethodSM 010302. *Journal of AOAC International*, 105(5), 1423–1427. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsac057>
- Linton, R. H., Eisel, W. G., & Muriana, P. M. (1997). Comparison of conventional plating methods and Petrifilm for the recovery of microorganisms in a ground beef processing facility. *Journal of Food Protection*, 60(9), 1032–1036. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.9.1032>
- Nelson, M. T., Pagotto, F., & Elliott, C. (2013). Comparison of 3M™ Petrifilm™ aerobic count plates to conventional pour plate techniques. *Journal of AOAC International*, 96(4), 717–722. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-038>
- Neogen Corporation. (2022). Soleris® microbial detection system: Technical reference guide. <https://www.neogen.com>
- Peris-Vicente, J., Carda-Broch, S., & Esteve-Romero, J. (2015). Validation of rapid microbiological methods. *Journal of Laboratory Automation*, 20(3), 259–264. <https://doi.org/10.1177/2211068214554612>
- Restaino, L., & Lyon, R. H. (1987). Efficacy of Petrifilm VRB for enumerating coliforms and *Escherichia coli* from frozen raw beef. *Journal of Food Protection*, 50(12), 1007–1011. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-50.12.1007>
- Salmerón, I., & Gutiérrez, C. (2021). Microbiological challenges in fishmeal and seafood-derived powders: A review. *Food Control*, 123, 107742.
- Scharff, R. L., & Farber, J. M. (2020). Microbiological recovery challenges in dried protein-rich ingredients. *Food Control*, 114, 107234.

- Schumacher, A., Lingle, C. K., Silbernagel, K. M., & Thompson-Strehlow, L. (2022). Validation of the 3M™ Petrifilm™ coliform count plate for enumeration of coliforms in food and beverage matrices: AOAC Performance Tested MethodsSM program. *Journal of AOAC International*, 105(3), 866–875. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsab137>
- Schumacher, A., Probst, A., & Fischer, M. (2021). Performance evaluation of Petrifilm plates for enumeration of coliforms in different food matrices. *Food Analytical Methods*, 14, 1130–1140.
- Silva, F. V., & Gibbs, P. A. (2021). Trends in microbial detection methods: Toward rapid and reliable approaches in food safety. *Current Opinion in Food Science*, 39, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.007>
- Singh, P., Mustapha, A., & Khan, S. U. (2018). Rapid detection methods for foodborne pathogens: Current applications and future perspectives. *Food Control*, 86, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.034>
- Skånseng, B., Urdahl, A. M., & Jarp, J. (2021). Application of rapid microbiological methods in complex food matrices. *Journal of Applied Microbiology*, 130(2), 389–401.
- Valderrama, W. B., Dudley, E. G., & Doores, S. (2016). Detection of foodborne pathogens using biosensors. *Food Analytical Methods*, 9(10), 2798–2810. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0488-3>
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection in the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*, 28(2), 232–254. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.12.004>

7. APÉNDICES Y ANEXOS

ANEXO A: Tipos de toma de muestra colectivas

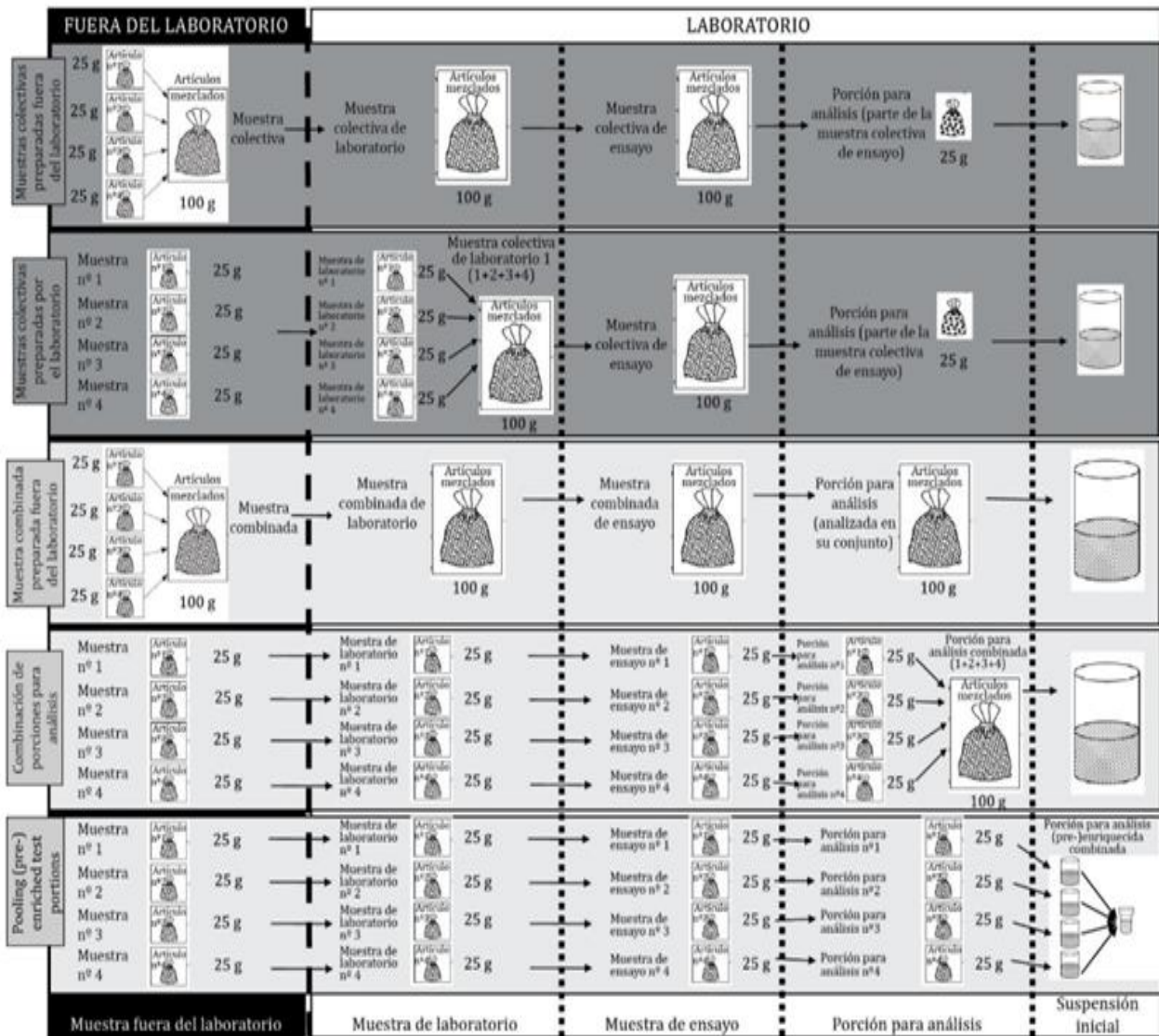


Figura 7.1. Procedimientos para obtener muestras colectivas y combinadas.

Fuente: (International Organization for Standardization, 2025)

ANEXO B: Tabla de referencia para determinar objetivos o criterios de validación

Table 991.14. Interlaboratory study results for total coliforms and *E. coli* on dry-film count plates

| Product | Level | Mean log ₁₀ CFU/g | s _p | s _R | RSD _p % | RSD _R % |
|--|--------|------------------------------|----------------|----------------|--------------------|--------------------|
| Total coliforms on coliform count plates | | | | | | |
| Ground turkey | Low | 1.845 | 0.193 | 0.296 | 10.5 | 16.1 |
| | Medium | 2.235 | 0.361 | 0.361 | 16.2 | 16.2 |
| | High | 2.744 | 0.105 | 0.270 | 3.8 | 9.9 |
| Fresh mushrooms | Low | 4.241 | 0.278 | 0.808 | 6.6 | 19.0 |
| | Medium | 4.999 | 0.662 | 1.141 | 13.2 | 22.8 |
| | High | 5.197 | 0.120 | 0.872 | 2.3 | 16.8 |
| Beef with gravy | Low | 1.069 | 0.243 | 0.288 | 22.7 | 27.0 |
| | Medium | 2.062 | 0.257 | 0.391 | 12.5 | 18.9 |
| | High | 2.732 | 0.233 | 0.320 | 8.5 | 11.7 |
| Cheese | Low | 0.783 | 0.172 | 0.172 | 21.9 | 21.9 |
| | Medium | 2.411 | 0.092 | 0.206 | 3.8 | 8.5 |
| | High | 3.434 | 0.212 | 0.364 | 6.2 | 10.6 |
| Wheat flour | Low | 2.635 | 0.291 | 0.874 | 11.1 | 33.2 |
| | Medium | 3.460 | 0.746 | 1.291 | 21.6 | 37.3 |
| | High | 4.049 | 0.873 | 1.550 | 21.6 | 38.3 |
| Nut meal | Low | 0.896 | 0.336 | 0.443 | 37.5 | 49.5 |
| | Medium | 1.345 | 0.486 | 0.699 | 36.2 | 52.0 |
| | High | 2.370 | 0.267 | 0.831 | 11.3 | 35.1 |

Figura 7 2. Reporte de resultados interlaboratorio de método AOAC 991.14 en diferentes matrices.

Fuente: (Latimer, 2016)

ANEXO C: Protocolo para analizar la incertidumbre de medición

Incertidumbre Técnica

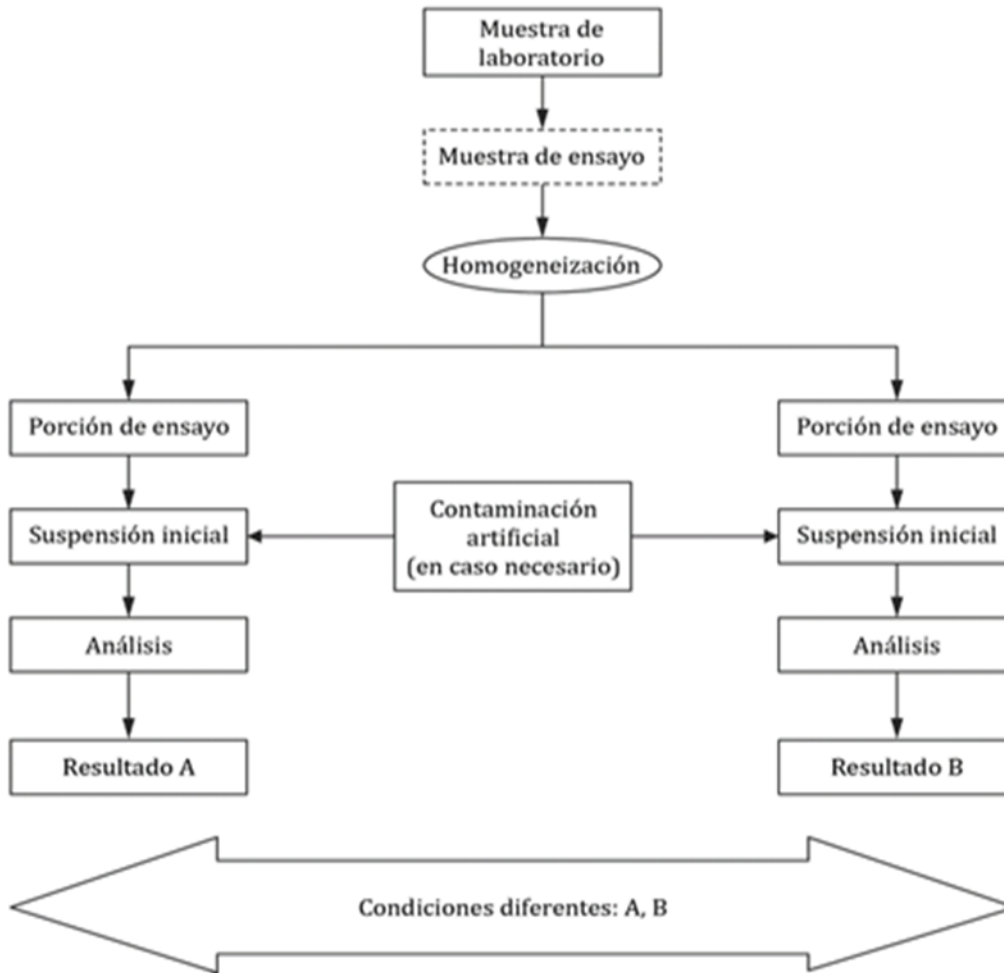


Figura 7.3. Protocolo para analizar exactamente dos porciones de ensayos de todas las muestras de laboratorio.

Fuente:(ISO, 2020)

Incertidumbre de la matriz

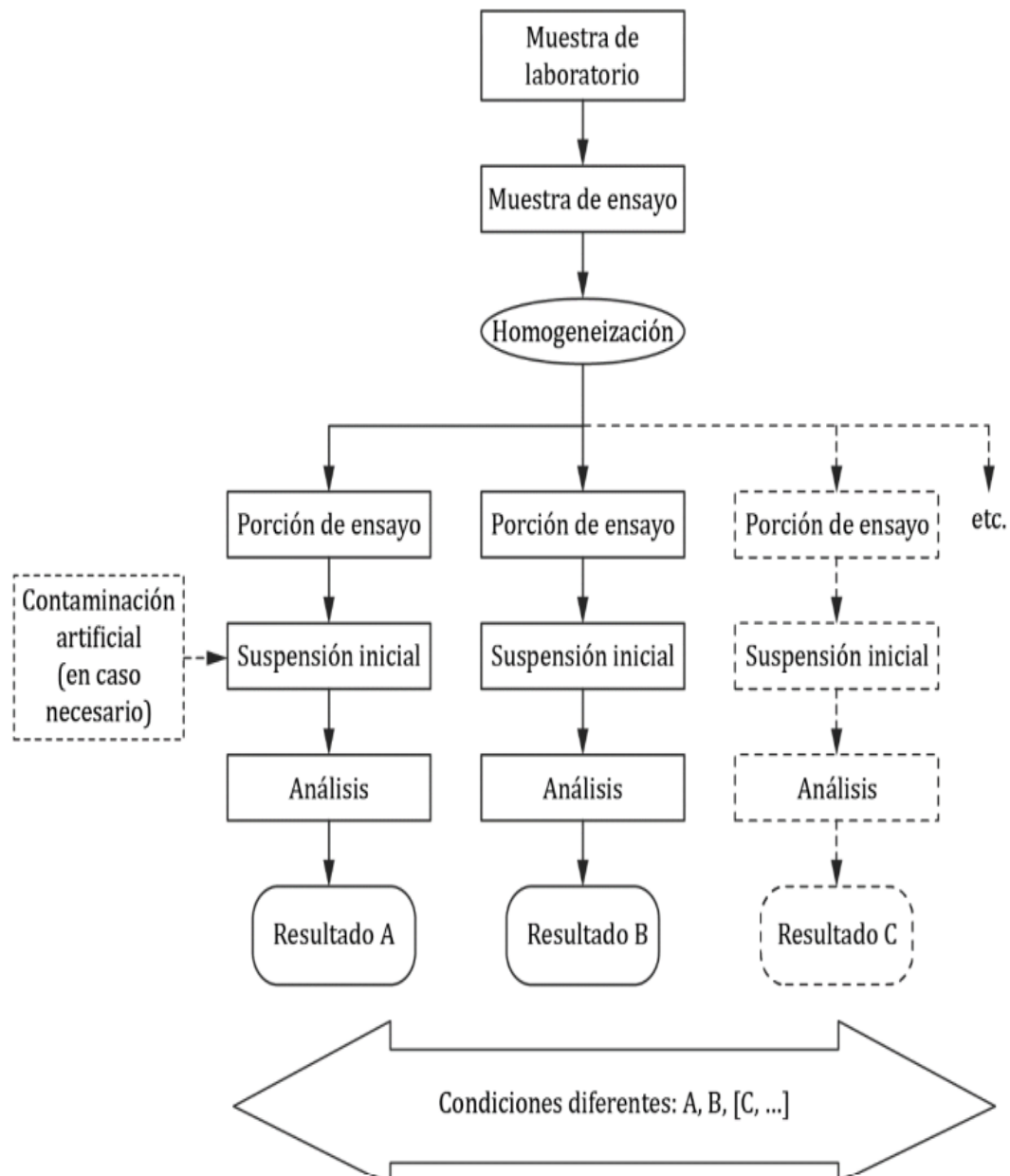


Figura 7.4. Diseño experimental para estimar la incertidumbre de la matriz a partir de un mínimo de dos porciones de ensayo de cada muestra de laboratorio. Diseño para cada muestra de laboratorio.

Fuente: (ISO, 2020).

ANEXO D: Protocolo de validación

1. PROPÓSITO

Establecer los lineamientos técnicos, estadísticos y documentales para la validación, verificación y revalidación de métodos microbiológicos cualitativos y cuantitativos, con el fin de demostrar que los métodos son aptos para el uso previsto y cumplen los requisitos de la NTE INEN-ISO/IEC 17025:2018, garantizando la confiabilidad de los resultados emitidos por el laboratorio.

2. ALCANCE

Este protocolo aplica a:

- Métodos microbiológicos normalizados, no normalizados, modificados y desarrollados internamente.
- Ensayos cualitativos (presencia/ausencia).
- Ensayos cuantitativos (UFC/g, UFC/mL).
- Procesos de:
 - ✓ Validación inicial
 - ✓ Verificación del desempeño
 - ✓ Revalidación
 - ✓ Confirmación del desempeño del método

Aplica a todas las matrices incluidas dentro del alcance técnico del laboratorio.

3. MATERIALES

- Equipos utilizados en el desarrollo de la validación y/o verificación.
- Material de vidrio volumétrico
- Métodos analíticos.

- Métodos normalizados sin modificaciones (requieren verificación del desempeño).
- Métodos normalizados con modificaciones (requieren validación parcial, enfocada en los parámetros afectados.)
- Métodos no normalizados o desarrollados internamente (requieren validación completa, conforme a ISO 16140).
- Material de referencia, controles positivos, cepas de referencia, cultivos de reservas, cultivo de trabajo, muestras, reactivos.
- Diseño de validación.
- Registros electrónicos de datos primarios de características de desempeño.
- Sistemas informáticos.
- Informe de validaciones.
- Hojas de datos y cálculos.
- Material de oficina: calculadora, bolígrafos, entre otros.
- Accesorios varios: mascarillas, gorros, gafas de protección, guantes y mandiles.

3.1 Calificación de los equipos.

- Se verificará que las características técnicas de todos los equipos que intervendrán en la validación del método son las adecuadas según el método de ensayo.
- El responsable de metrología (Metrólogo junior) se encargará de realizar dicha verificación de los equipos y aprobación

4. RESPONSABILIDADES

Responsables del laboratorio

- Aprobar el diseño de validación/verificación.
- Aprobar el informe final.
- Autorizar el uso del método.

- Gestionar la provisión de los suministros necesarios requeridos para validar los métodos analíticos.
- Verificar la adecuación de los equipos y la calificación del personal para la realización de la validación.

Responsables técnicos

- Como mínimo dos técnicos autorizados realizarán la validación de los métodos analíticos.
- Ejecutar los ensayos conforme a los procedimientos aprobados.
- Registrar los datos primarios.
- Cumplir con los requisitos de competencia técnica

Responsable de validación (Gestión de Calidad)

- Verificar el cumplimiento del diseño experimental.
- Evaluar los resultados frente a los criterios de aceptación.
- Declarar la validez o restricciones del método.
- Asegurar la trazabilidad documental.
- Solicitará al responsable del Laboratorio el suministro de insumos que se requieran para validar el método.
- Entregará al responsable de la Actividad toda la documentación generada luego de terminado el proceso junto con el informe.
- Archivar y controlar la trazabilidad documental.

5. REFERENCIAS

- NTE INEN- ISO/IEC. 17025:2018. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

- ISO 7218 Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements for microbiological examinations
- ISO 19036 Microbiology of the food chain – Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations
- ISO 16140 series, Microbiology of the food chain – Method validation
- EURACHEM. Accreditation for Microbiological. Laboratories. Third edition (2023). Editors Bertil Magnusson (SE) Kyriacos C Tsimillis (CY)

6. DESCRIPCIÓN

6.1 Clasificación del método

Se debe clasificar el método según la forma de reporte de los resultados; en el caso de:

- Métodos cualitativos: resultados reportados como presencia o ausencia.
- Métodos cuantitativos: resultados reportados como UFC/g o UFC/mL.

6.2 Elección del proceso

Se establece el tipo de proceso que se ejecutará (validación o verificación), esto dependerá de:

| CONDICIÓN DEL MÉTDO | PROCESO |
|--|---------------------|
| Método normalizado sin modificaciones y dentro del alcance | Verificación |
| Método normalizado con modificaciones | Validación parcial |
| Método no normalizado o desarrollado internamente | Validación completa |
| Uso fuera de matriz o rango validado | Validación |

6.3 Validación de métodos cuantitativos

6.3.1 Parámetros de desempeño

De acuerdo con ISO 16140, ISO 19036 y EURACHEM:

- Selectividad / Especificidad
- Intervalo o rango
- Precisión:
 - ✓ Repetibilidad
 - ✓ Precisión intermedia
- Exactitud / Veracidad
- Límite de detección (LOD)
- Límite de cuantificación (LOQ)
- Robustez (cuando aplique)
- Incertidumbre de la medición

6.3.2 Diseño experimental

- Mínimo 3 niveles de concentración (bajo, medio, alto).
- Mínimo 6–10 réplicas por nivel.
- Distribución en al menos 2 días y, cuando aplique, 2 analistas.
- Uso de matrices representativas.
- Inclusión de controles positivos, blancos y controles de esterilidad.

En el registro del diseño experimental y estadístico se detallará lo siguiente:

- ✓ Objeto
- ✓ Alcance: Consta de los siguientes enunciados, procedimiento de ensayo, método de referencia, tipo de método, equipos utilizados, material volumétrico e insumos de carácter reactivos de extracción y amplificación y personal participante en el estudio
- ✓ Referencias
- ✓ Necesidad Analítica.
- ✓ Responsabilidades

- ✓ Características de desempeño. Fijación de objetivos

6.3.3 Tratamiento Estadístico

Media

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i$$

Desviación estándar de repetibilidad

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

RSD de repetibilidad

$$RSD(r) = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100$$

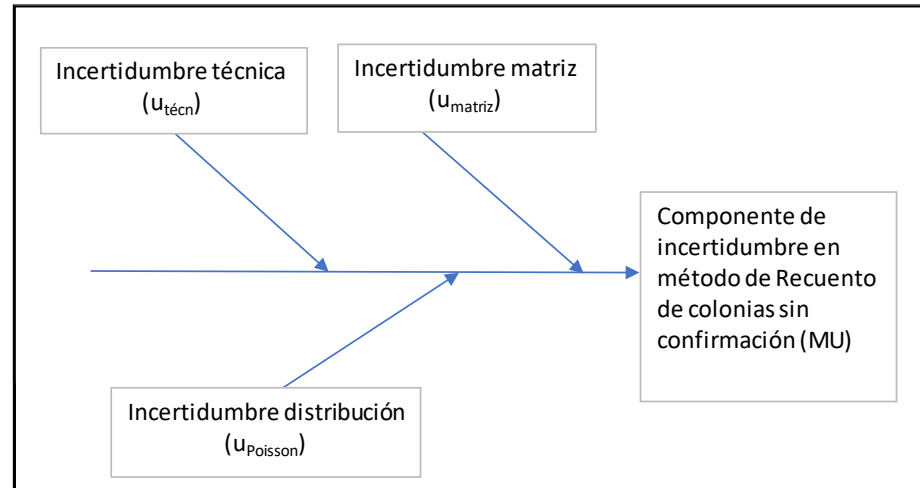
Sesgo relativo

$$\% \text{ sesgo} = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$$

6.3.4 Estimación de la incertidumbre

- Se debe aplicar ISO 19036:2020 y se debe considerar para cálculo de la incertidumbre combinada los siguientes componentes o aportes:
 - ✓ Incertidumbre técnica
 - ✓ Incertidumbre de la matriz

✓ Incertidumbre de distribución.



$$u_c(y) = \sqrt{u_{téc}^2 + u_{matriz}^2 + u_{Poisson}^2}$$

- Para determinar la incertidumbre técnica se debe seguir el siguiente esquema de la norma 19036 y se determina S_{RI};

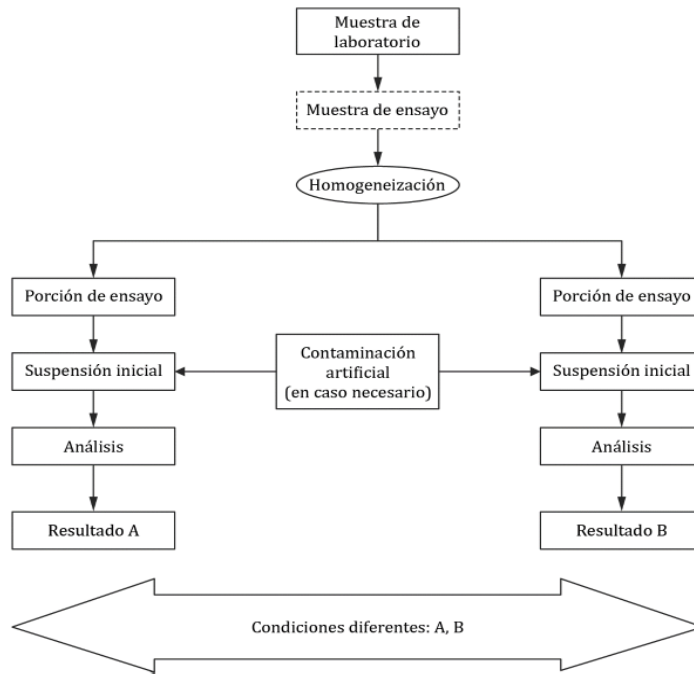


Figura 2 - Protocolo experimental para la estimación de la reproducibilidad intralaboratorio. Dos determinaciones en todas las muestras de laboratorio

NOTA 1: El diseño experimental incluirá dos factores de variación independientes (analista y lote de diluyente), combinados de forma cruzada entre las porciones de ensayo con el fin de capturar la variabilidad técnica global del método, sin descomponer los efectos individuales.

NOTA 2: El límite de 30 colonias hace referencia a la suma del número total de colonias contadas en todas las placas conservadas, ΣC , para cada resultado individual. Deberían excluirse los resultados de recuentos basados en menos de 30 colonias contadas, así como los recuentos por encima del número máximo por placa (en la mayor parte de los casos, 300 ufc/placa o inferior, según marque la norma específica).

El SRI se calcula mediante la fórmula:

$$s_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

- Para determinar la incertidumbre matriz se debe seguir el siguiente esquema de la norma 19036; y se determina SRI

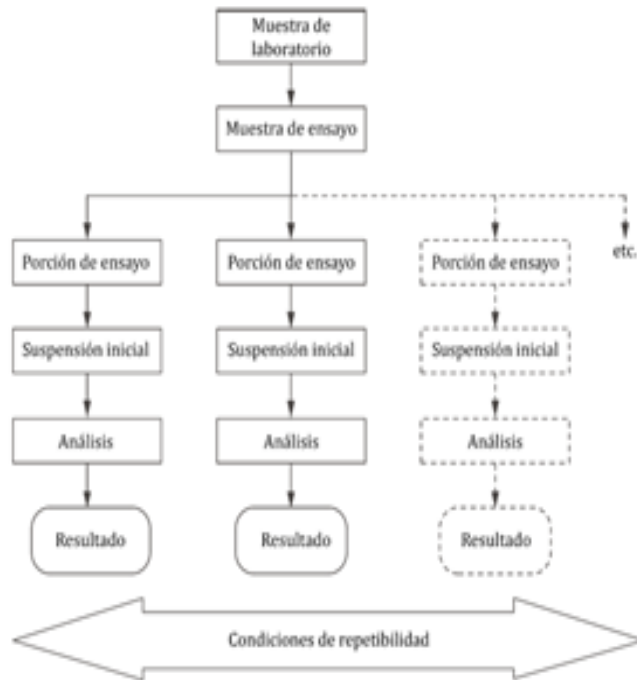


Figura 3 - Diseño experimental para estimar la incertidumbre de la matriz a partir de un mínimo de dos porciones de ensayo de cada muestra de laboratorio. Diseño para cada muestra de laboratorio

NOTA 1: Todas las porciones de ensayo se obtuvieron a partir de una única muestra de laboratorio, lo cual es apropiado dado que se trata de una matriz nueva no evaluada previamente por el laboratorio.

NOTA 2: El límite de 30 colonias hace referencia a la suma del número total de colonias contadas en todas las placas conservadas, ΣC , para cada resultado individual. Deberían excluirse los resultados de recuentos basados en menos de 30 colonias contadas, así como los recuentos por encima del número máximo por placa (en la mayor parte de los casos, 300 ufc/placa o inferior, según marque la norma específica).

El SRI se calcula mediante la fórmula:

$$s_{IR} \text{ o } s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{p_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (p_i - 1)}}$$

donde

i es el identificador de la muestra de laboratorio ($i = 1, 2, \dots, n$);

j es el identificador de la porción de ensayo dentro de la muestra i ($j = 1, 2, \dots, p_i$);

$y_{ij} = \log_{10} x_{ij}$.

- Para determinar la incertidumbre de la distribución (u_{Poisson}) se debe seguir el siguiente esquema de la norma 19036
 - ✓ Depende del número total de colonias contadas utilizadas en el cálculo de los resultados
 - ✓ La tabla 2 recoge los valores de la incertidumbre típica de Poisson, u_{Poisson} , en unidades \log_{10} , para valores de recuento (ΣC) comprendidos entre 1 y 40.

Tabla 2 - Valores de u_{Poisson} para valores de ΣC comprendidos entre 1 y 40

| | | | | | | | |
|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|
| ΣC | u_{Poisson} | ΣC | u_{Poisson} | ΣC | u_{Poisson} | ΣC | u_{Poisson} |
| 1 | 0,434 | 11 | 0,131 | 21 | 0,095 | 31 | 0,078 |
| 2 | 0,307 | 12 | 0,125 | 22 | 0,093 | 32 | 0,077 |
| 3 | 0,251 | 13 | 0,120 | 23 | 0,091 | 33 | 0,076 |
| 4 | 0,217 | 14 | 0,116 | 24 | 0,089 | 34 | 0,074 |
| 5 | 0,194 | 15 | 0,112 | 25 | 0,087 | 35 | 0,073 |
| 6 | 0,177 | 16 | 0,109 | 26 | 0,085 | 36 | 0,072 |
| 7 | 0,164 | 17 | 0,105 | 27 | 0,084 | 37 | 0,071 |
| 8 | 0,154 | 18 | 0,102 | 28 | 0,082 | 38 | 0,070 |
| 9 | 0,145 | 19 | 0,100 | 29 | 0,081 | 39 | 0,070 |
| 10 | 0,137 | 20 | 0,097 | 30 | 0,079 | 40 | 0,069 |

- ✓ Si $\Sigma C = 0$, es decir, no se ha contado ninguna colonia, $u_{\text{Poisson}} = 0,434$.
- ✓ Para valores distintos de ΣC , u_{Poisson} se puede calcular utilizando la fórmula.

$$u_{\text{Poisson}} = \frac{1 / \ln(10)}{\sqrt{\sum c}} = \frac{0,4343}{\sqrt{\sum c}}$$

- Se incluye en el informe una declaración explícita de que la MU señalada es la incertidumbre expandida, junto con una declaración del nivel de confianza y una indicación que la MU se ha estimado conforme a este documento. (ISO 19036:2020) y se expresará la incertidumbre expandida: $U = k \times uc$ ($k = 2$).
- Una vez se ha calculado la MU expandida puede expresarse en el informe de ensayo junto con el resultado del ensayo, como un intervalo en escala log10 o como valores en números naturales (ufc/g o ufc/ml), como ilustran los siguientes ejemplos alternativos: (ISO 19036:2020)
 - a) log10 del resultado con $\pm U$: $y \pm U$ log10 ufc/g o ufc/ml;

por ejemplo, $5,00 \pm 0,31$ log10 ufc/g;
 - b) log10 del resultado con límites: y log10 ufc/g o ufc/ml [$y - U$; $y + U$];

por ejemplo, $5,00$ log10 ufc/g [4,69; 5,31];
 - c) resultado en números naturales con límites: x ufc/g o ufc/ml [10^{y-U} ; 10^{y+U}];
por ejemplo, $1,0 \times 10^5$ ufc/g [$4,9 \times 10^4$; $2,0 \times 10^5$].

6.3.5 Criterios de aceptación

- $RSD(r) \leq$ límite definido por norma, bibliografía o históricos del laboratorio.
- Sesgo dentro de límites aceptables.
- LOQ definido como el nivel más bajo con precisión y sesgo aceptables.
- Robustez: variaciones no generan diferencias significativas.
- Incertidumbre: Deberían excluirse los resultados de recuentos basados en menos de 30 colonias contadas, así como los recuentos por encima del número máximo por placa (en la mayor parte de los casos, 300 UFC/placa o inferior, según marque la norma específica).
- Análisis de Varianzas entre analistas Si $F > F_{\text{critico}}$ Existen diferencias significativas entre las medias de los analistas, indicando que los datos no son lineales; en caso contrario las diferencias entre las medias de los analistas no son significativas, y los datos son lineales.
- Desviación estándar estimada eBIAS su límite de aceptabilidad es que la diferencia absoluta entre dos resultados es inferior a $0,5 \log_{10}$
- Desviación estándar intralaboratorio se límite de aceptabilidad es $S_{IR} \leq 2 * S_R$

Acción si no cumple: restringir rango, ajustar método o revalidar.

6.4 Verificación de métodos cuantitativos

- Se realizan en 2 etapas: verificación de la implementación y verificación del producto.
- Comparación con datos de validación del método.
- Evaluación de repetibilidad y exactitud.
- Ensayos de control positivo y negativo.

➤ Confirmación de resultados esperados

6.4.1 Características de rendimiento

Según 16140-3

| Método | Característica de rendimiento | Verificación de la Implementación | Verificación de artículo (alimentarios) |
|--|--|--|--|
| Cuantitativo | Desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR}) | x | No aplica |
| | Desviación estimada (e_{Bias}) | No aplica | x |
| NOTA 1: La relación entre la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR}) y la norma ISO 19036 se aplica en el apartado de 6.1 (ISO 16140-3) | | | |

6.4.2 Diseño del experimento. Protocolo técnico para métodos cuantitativos

6.4.2.1 Selección de la matriz

La matriz utilizada debe ser representativa de las muestras analizadas rutinariamente por el laboratorio y compatible con el método.

Para verificación de la implementación como mínimo 10 muestras deben evaluarse y cada una analizada en 2 porciones y cada porción debe ser con una condición diferente como analista, lote, equipo.

Para la verificación de producto se analiza la misma muestra inoculadas a diferentes concentraciones de inóculo.

Para incertidumbre el número de muestra dependerá lo que indique la norma 19036 según sea el caso.

6.4.2.2 Niveles de concentración

Se deben evaluar al menos dos niveles de concentración del microorganismo objetivo dentro del rango de cuantificación del método:

Nivel bajo: cercano al límite inferior de cuantificación

Nivel medio o alto: representativo del uso rutinario

Los niveles deben permitir evaluar la variabilidad del método.

6.4.2.3 Número de réplicas

Para cada nivel de concentración se recomienda analizar ≥ 5 réplicas independientes por nivel.

Las réplicas deben prepararse y analizarse de forma independiente.

Para el cálculo de la incertidumbre considere lo que estable la Norma 19036.

6.4.2.4 Preparación de las muestras

➤ Microorganismo

Se utilizará una cepa adecuada del microorganismo objetivo, preferentemente una cepa de referencia reconocida.

➤ Inoculación

La inoculación debe realizarse de manera que:

Se garantice una distribución homogénea del microorganismo

Se minimice la variabilidad introducida durante la preparación

6.4.2.5 Ejecución del método

➤ Analizar cada réplica siguiendo estrictamente el procedimiento del método.

➤ Utilizar medios, reactivos y equipos dentro de su vigencia.

➤ Incubar bajo las condiciones especificadas

➤ Expresar los resultados en las unidades establecidas por el método (ej. UFC/g, UFC/mL)

6.4.2.6 Tratamiento estadístico de los resultados

- Desviación estándar intralaboratorio (SIR)

$$SIR = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

- Desviación estimada (eBias).

Diferencia LOGARITMICA 10 absoluta entre el resultado de matriz contaminada y la suspensión del inculo.

- Evaluación de la repetibilidad

Para cada nivel de concentración se deben calcular:

- ✓ Media de los resultados
- ✓ Desviación estándar
- ✓ Coeficiente de variación (CV % o RSD %)

NOTA: Estos parámetros permiten evaluar la variabilidad interna del método.

- Evaluación del sesgo (cuando aplique)

Cuando exista un valor de referencia o valor esperado, se puede evaluar el sesgo comparando el resultado medio obtenido con dicho valor.

6.4.2.7 Criterios de aceptación

El método cuantitativo se considera verificado cuando:

- La variabilidad observada es coherente con el desempeño esperado del método

- No se detectan desviaciones técnicas significativas.
- Los resultados son consistentes entre réplicas y niveles.
- El comportamiento del método es compatible con su validación original.
- Análisis de Varianzas entre analistas Si $F > F_{\text{crítico}}$ Existen diferencias significativas entre las medias de los analistas, indicando que los datos no son lineales; en caso contrario las diferencias entre las medias de los analistas no son significativas, y los datos son lineales.
- Desviación estándar estimada eBIAS su límite de aceptabilidad es que la diferencia absoluta entre dos resultados es inferior a $0,5 \log_{10}$
- Desviación estándar intralaboratorio se límite de aceptabilidad es $S_{IR} \leq 2 \cdot S_R$

6.4.2.8 Incertidumbre de medición

Ver el numeral 6.3.4 del presente instructivo

6.5 Revalidación

Se debe realizar cuando:

- ✓ Existan cambios en la matriz.
- ✓ Se modifique el método.
- ✓ Se introduzca nuevo equipamiento crítico.
- ✓ Se detecten desviaciones significativas.

6.6 Control de calidad analítico

- ✓ Uso de controles positivos y negativos.
- ✓ Cepas de referencia.
- ✓ Ensayos de aptitud (interlaboratorios).

- ✓ Gráficos de control cuando aplique.

6.7 Documentación y registros

- ✓ Registro de equipamiento para validación/verificación de método.
- ✓ Diseño experimental y estadístico del estudio de validación/verificación.
- ✓ Protocolos de ensayo (método de ensayo).
- ✓ Informe De Validación/Verificación del Método de Ensayo

6.8 Informe de validación / verificación

Debe incluir:

- Fecha de emisión del informe
- Periodos de ejecución del estudio
- Identificación del método de ensayo.
- Identificación del método de referencia
- Tipo de método
- Personas participantes en el estudio
- Equipos utilizados en el estudio
- Material de referencia, cepas, medios de cultivo
- Campo de aplicación
- Tipo de ítems de ensayo
- Resultados y análisis estadístico.
- Incertidumbre (si aplica).
- Declaración de validación.
- Anexos (listado de registro)
- Nombre y firma de elaborado por:
- Nombre y firma de revisado por:
- Nombre y firma de aprobado por:

APÉNDICE A: Características de desempeño

Resultados de la siembra de las muestras del estudio de validación



Figura 7.5. Fotos de siembra de verificación de contaminación de muestra seleccionadas.

Resultados de Inclusividad y exclusividad

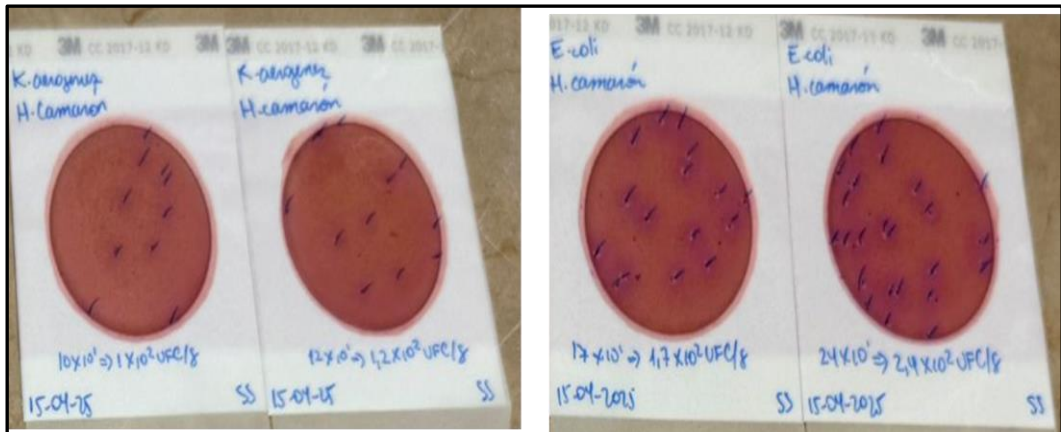


Figura 7.6. Fotos de siembra de la evaluación de la inclusividad.



Figura 7.7. Fotos de siembra de la evaluación de la exclusividad.

Resultados de Precisión

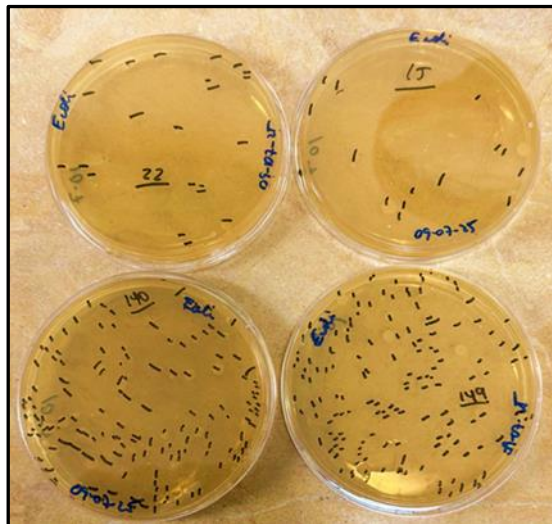


Figura 7.8. Fotos de siembra del inóculo inicial $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.



Figura 7.9. Fotos de siembra para evaluación de la desviación estándar intralaboratorio.

Tabla 7.1. Datos resultantes de la siembra del Nivel A para el estudio de precisión entre analistas.

| DATOS ANALITICOS | | | | | | | |
|-------------------|---------|------------|---|--------------------------|------|-----------------|----------|
| Código de Muestra | Niveles | Analizados | Resultado Promedio Inóculo Inóculo (UFC/ml) | Resultado Inóculo UFC/ml | | Resultado UFC/g | ANALISTA |
| MHC-01 | A-1 | 1 | 1010 | 980 | 1040 | 1020 | A 1 |
| | A-2 | 2 | 1010 | 980 | 1040 | 1030 | |
| | A-3 | 3 | 1010 | 980 | 1040 | 1140 | |
| | A-4 | 4 | 1010 | 980 | 1040 | 1110 | |
| | A-5 | 5 | 1010 | 980 | 1040 | 1050 | |
| | A-6 | 6 | 1010 | 980 | 1040 | 980 | |
| | A-7 | 7 | 1010 | 980 | 1040 | 1150 | |
| | A-8 | 8 | 1010 | 980 | 1040 | 1080 | |
| | A-9 | 9 | 1010 | 980 | 1040 | 1100 | |
| | A-10 | 10 | 1010 | 980 | 1040 | 1070 | |
| MHC-01 | A-1 | 11 | 1200 | 1400 | 1000 | 1120 | A 2 |
| | A-2 | 12 | 1200 | 1400 | 1000 | 1130 | |
| | A-3 | 13 | 1200 | 1400 | 1000 | 1140 | |
| | A-4 | 14 | 1200 | 1400 | 1000 | 1100 | |
| | A-5 | 15 | 1200 | 1400 | 1000 | 1090 | |
| | A-6 | 16 | 1200 | 1400 | 1000 | 1000 | |
| | A-7 | 17 | 1200 | 1400 | 1000 | 1080 | |
| | A-8 | 18 | 1200 | 1400 | 1000 | 1150 | |
| | A-9 | 19 | 1200 | 1400 | 1000 | 1110 | |
| | A-10 | 20 | 1200 | 1400 | 1000 | 970 | |

Tabla 7.2. Datos resultantes de la siembra del Nivel B para el estudio de precisión entre analistas.

| DATOS ANALITICOS | | | | | | | |
|-------------------|---------|------------|---|--------------------------|-----|-----------------|----------|
| Código de Muestra | Niveles | Analizados | Resultado Promedio Inóculo Inóculo (UFC/ml) | Resultado Inóculo UFC/ml | | Resultado UFC/g | ANALISTA |
| MHC-01 | B-1 | 1 | 123 | 121 | 125 | 100 | A 1 |
| | B-2 | 2 | 123 | 121 | 125 | 80 | |
| | B-3 | 3 | 123 | 121 | 125 | 180 | |
| | B-4 | 4 | 123 | 121 | 125 | 80 | |
| | B-5 | 5 | 123 | 121 | 125 | 80 | |
| | B-6 | 6 | 123 | 121 | 125 | 130 | |
| | B-7 | 7 | 123 | 121 | 125 | 130 | |
| | B-8 | 8 | 123 | 121 | 125 | 110 | |
| | B-9 | 9 | 123 | 121 | 125 | 150 | |
| | B-10 | 10 | 123 | 121 | 125 | 110 | |
| MHC-01 | B-1 | 11 | 123 | 121 | 125 | 100 | A 2 |
| | B-2 | 12 | 123 | 121 | 125 | 110 | |
| | B-3 | 13 | 123 | 121 | 125 | 160 | |
| | B-4 | 14 | 123 | 121 | 125 | 130 | |
| | B-5 | 15 | 123 | 121 | 125 | 90 | |
| | B-6 | 16 | 123 | 121 | 125 | 110 | |
| | B-7 | 17 | 123 | 121 | 125 | 100 | |
| | B-8 | 18 | 123 | 121 | 125 | 180 | |
| | B-9 | 19 | 123 | 121 | 125 | 110 | |
| | B-10 | 20 | 123 | 121 | 125 | 180 | |

Tabla 7.3. Datos resultantes de la siembra del Nivel C para el estudio de precisión entre analistas.

| DATOS ANALITICOS | | | | | | | |
|-------------------|---------|------------|---|--------------------------|----|-----------------|----------|
| Código de Muestra | Niveles | Analizados | Resultado Promedio Inóculo Inóculo (UFC/ml) | Resultado Inóculo UFC/ml | | Resultado UFC/g | ANALISTA |
| MHC-01 | C-1 | 1 | 24 | 20 | 28 | 30 | A 1 |
| | C-2 | 2 | 24 | 20 | 28 | 10 | |
| | C-3 | 3 | 24 | 20 | 28 | 20 | |
| | C-4 | 4 | 24 | 20 | 28 | 20 | |
| | C-5 | 5 | 24 | 20 | 28 | 30 | |
| | C-6 | 6 | 24 | 20 | 28 | 20 | |
| | C-7 | 7 | 24 | 20 | 28 | 20 | |
| MHC-01 | C-1 | 11 | 24 | 20 | 28 | 20 | A 2 |
| | C-2 | 12 | 24 | 20 | 28 | 30 | |
| | C-3 | 13 | 24 | 20 | 28 | 10 | |
| | C-4 | 14 | 24 | 20 | 28 | 20 | |
| | C-5 | 15 | 24 | 20 | 28 | 20 | |
| | C-6 | 16 | 24 | 20 | 28 | 20 | |
| | C-7 | 17 | 24 | 20 | 28 | 30 | |

Tabla 7.4. Resumen de resultados analíticos Nivel A de precisión entre analistas.

| NIVEL A | | | | | | |
|------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------|-------------------|------|
| No. | Analista 1 (A1) | Analista 2 (A2) | Inóculo A1 UFC/ml | 1010 | Inóculo A2 UFC/ml | 1200 |
| | | | Inóculo log(10) | 3,00 | Inóculo log(10) | 3,08 |
| 1 | 1020 | 1120 | | | | |
| 2 | 1030 | 1130 | | | | |
| 3 | 1140 | 1140 | | | | |
| 4 | 1110 | 1100 | | | | |
| 5 | 1050 | 1090 | | | | |
| 6 | 980 | 1000 | | | | |
| 7 | 1150 | 1080 | | | | |
| 8 | 1080 | 1150 | | | | |
| 9 | 1100 | 1110 | | | | |
| 10 | 1070 | 970 | | | | |
| LOG10 | | | | | | |
| 1 | 3,009 | 3,049 | | | | |
| 2 | 3,013 | 3,053 | | | | |
| 3 | 3,057 | 3,057 | | | | |
| 4 | 3,045 | 3,041 | | | | |
| 5 | 3,021 | 3,037 | | | | |
| 6 | 2,991 | 3,000 | | | | |
| 7 | 3,061 | 3,033 | | | | |
| 8 | 3,033 | 3,061 | | | | |
| 9 | 3,041 | 3,045 | | | | |
| 10 | 3,029 | 2,987 | | | | |
| | | | Promedio | | | |
| Promedio por analista | 3,03 | 3,04 | | 3,03 | | |
| % Recuperación | 106,11 | 90,62 | | 98,37 | | |

Tabla 7 5. Resumen de resultados analíticos Nivel B de precisión entre analistas.

| NIVEL B | | | | | | |
|------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------|--------------------------|------|
| No. | Analista 1 (A1) | Analista 2 (A2) | Inóculo A1 UFC/ml | 123 | Inóculo A2 UFC/ml | 123 |
| 1 | 100 | 110 | Inóculo log(10) | 2,09 | Inóculo log(10) | 2,09 |
| 2 | 80 | 160 | | | | |
| 3 | 180 | 130 | | | | |
| 4 | 80 | 90 | | | | |
| 5 | 80 | 110 | | | | |
| 6 | 130 | 100 | | | | |
| 7 | 130 | 180 | | | | |
| 8 | 110 | 110 | | | | |
| 9 | 150 | 180 | | | | |
| 10 | 110 | 30 | | | | |
| LOG10 | | | | | | |
| 1 | 2,000 | 2,041 | | | | |
| 2 | 1,903 | 2,204 | | | | |
| 3 | 2,255 | 2,114 | | | | |
| 4 | 1,903 | 1,954 | | | | |
| 5 | 1,903 | 2,041 | | | | |
| 6 | 2,114 | 2,000 | | | | |
| 7 | 2,114 | 2,255 | | | | |
| 8 | 2,041 | 2,041 | | | | |
| 9 | 2,176 | 2,255 | | | | |
| 10 | 2,041 | 1,477 | Promedio | | | |
| Promedio por analista | 2,05 | 2,04 | 2,04 | | | |
| % Recuperación | 90,20 | 88,82 | 89,51 | | | |

Tabla 7.6. Resumen de resultados analíticos Nivel C de precisión entre analistas.

| NIVEL C | | | | | | |
|------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|-----------|--------------------------|-----------|
| No. | Analista 1 (A1) | Analista 2 (A2) | Inóculo A1 UFC/ml | 24 | Inóculo A2 UFC/ml | 24 |
| 1 | 30 | 20 | Inóculo log(10) | 1,38 | Inóculo log(10) | 1,38 |
| 2 | 10 | 30 | | | | |
| 3 | 20 | 10 | | | | |
| 4 | 20 | 20 | | | | |
| 5 | 30 | 20 | | | | |
| 6 | 20 | 20 | | | | |
| 7 | 20 | 30 | | | | |
| LOG10 | | | | | | |
| 1 | 1,48 | 1,30 | | | | |
| 2 | 1,00 | 1,48 | | | | |
| 3 | 1,30 | 1,00 | | | | |
| 4 | 1,30 | 1,30 | | | | |
| 5 | 1,48 | 1,30 | | | | |
| 6 | 1,30 | 1,30 | | | | |
| 7 | 1,30 | 1,48 | Promedio | | | |
| Promedio por analista | 1,31 | 1,31 | 1,31 | | | |
| % Recuperación | 84,75 | 84,75 | 84,75 | | | |

Tabla 7.7. Cálculo de los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos del nivel A (Análisis de Varianza).

| NIVEL A | | | | |
|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|
| | Analista 1 | Analista 2 | | |
| 1 | 3,0086 | 3,0492 | | |
| 2 | 3,0128 | 3,0531 | | |
| 3 | 3,0569 | 3,0569 | | |
| 4 | 3,0453 | 3,0414 | | |
| 5 | 3,0212 | 3,0374 | | |
| 6 | 2,9912 | 3,0000 | | |
| 7 | 3,0607 | 3,0334 | | |
| 8 | 3,0334 | 3,0607 | | |
| 9 | 3,0414 | 3,0453 | | |
| 10 | 3,0294 | 2,9868 | | |
| Promedio | 3,03 | 3,04 | ECUACIONES | |
| s | 0,02205 | 0,02439 | Desviación estándar | $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ |
| s ² | 0,00049 | 0,00060 | Varianza | $s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$ |
| n _{ij} | 9 | 9 | n _{ij} = n-1 | |
| n _{ij} s ² | 0,00438 | 0,00536 | | |
| n= total réplicas= 10 | | p=total analistas=2 | | |
| ECUACIONES | | | | |
| Fuente de variación | Suma de cuadrados (SS) | Grados de libertad (n) | Cuadrado medio (MS) | |
| Dentro-grupos SS _d | SS _d = $\sum n_i s_i^2$ | n _d = p(n-1) | MS _d = | SS _d / n _d |
| Total SS _t | SS _t = $\sum n_i s_i^2$ | n _t = pn-1 | | - |
| Muestra | Fuente de variación | Suma de cuadrados (SS) | Grados de libertad (n) | Cuadrados medios |
| Harina de camarón | Dentro-grupos SS _d | 0,0097 | 18 | MS _d = 0,00054 |
| | Total SS _t | 0,0099 | 19 | |

Tabla 7 8. Cálculo del %RSDIR =%CV los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos del nivel A (Análisis de Varianza).

| | | | | |
|----------|---------------------|--------|------------------------|--|
| S_{IR} | Media (\bar{x}) | %RSDIR | $S_{IR} = \sqrt{MS_d}$ | $\%RSDIR = \frac{S_{IR}}{\bar{x}} * 100$ |
| 0,023 | 3,03 | 0,77 | | |

Tabla 7 9. Nivel A (Análisis de Varianza por solo factor Excel). Evaluación de diferencias significativas entre analista.

| Análisis de varianza de un factor (Datos emitidos utilizando excel) | | | | | | |
|---|----------------------|---------------------------------|---------------------------|----------|--------------|----------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Analista 1 | 10 | 30,301 | 3,030 | 0,000 | | |
| Analista 2 | 10 | 30,364 | 3,036 | 0,001 | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 0,0002 | 1 | 0,0002 | 0,3701 | 0,5506 | 4,4139 |
| Dentro de los grupos | 0,0097 | 18 | 0,0005 | | | |
| Total | 0,0099 | 19 | | | | |
| <p>Criterio de decisión: Comparar el valor F calculado de para k-1 y n-k grados de libertad a un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Si $F > F_{\text{crítico}}$ Existen diferencias significativas entre las medias de los analistas, indicando que los datos no son lineales; en caso contrarios las diferencias entre las medias de los analistas no son significativas, y los datos son lineales.</p> | | | | | | |
| Conclusión: | | | | | | |
| F | Valor crítico para F | Diferencia Significativa | | | | |
| 0,37 | 4,41 | No hay diferencia significativa | | | | |

Tabla 7.10. Cálculo de los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos del nivel B (Análisis de Varianza) .

| NIVEL B | | | | |
|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|
| | Analista 1 | Analista 2 | | |
| 1 | 2,000 | 2,041 | | |
| 2 | 1,903 | 2,204 | | |
| 3 | 2,255 | 2,114 | | |
| 4 | 1,903 | 1,954 | | |
| 5 | 1,903 | 2,041 | | |
| 6 | 2,114 | 2,000 | | |
| 7 | 2,114 | 2,255 | | |
| 8 | 2,041 | 2,041 | | |
| 9 | 2,176 | 2,255 | | |
| 10 | 2,041 | 1,477 | | |
| Promedio | 2,05 | 2,04 | ECUACIONES | |
| s | 0,122 | 0,224 | Desviación estándar | $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ |
| s ² | 0,015 | 0,050 | Varianza | $s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$ |
| n _{ij} | 9 | 9 | n _{ij} = n-1 | |
| n _{ij} s ² | 0,133 | 0,451 | | |
| n= total réplicas= 10 | | p=total analistas=2 | | |
| EQUACIONES | | | | |
| Fuente de variación | Suma de cuadrados (SS) | Grados de libertad (n) | Cuadrado medio (MS) | |
| Dentro-grupos SS _d | SS _d = $\sum n_i s_i^2$ | n _d = p(n-1) | MS _d = | SS _d / n _d |
| Total SS _t | SS _t = $\sum n_i s_i^2$ | n _t = pn-1 | | - |
| Muestra | Fuente de variación | Suma de cuadrados (SS) | Grados de libertad (n) | Cuadrados medios |
| Harina de camarón | Dentro-grupos SS _d | 0,584 | 18 | MS _d = 0,032 |
| | Total SS _t | 0,584 | 19 | |

Tabla 7 11. Cálculo del %RSDIR =%CV los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos del nivel B (Análisis de Varianza).

| | | | | |
|----------|---------------------|--------|------------------------|--|
| S_{IR} | Media (\bar{x}) | %RSDIR | $S_{IR} = \sqrt{MS_d}$ | $\%RSDIR = \frac{S_{IR}}{\bar{x}} * 100$ |
| 0,180 | 2,04 | 8,82 | | |

Tabla 7.12. Nivel B (Análisis de Varianza por solo factor Excel). Evaluación de diferencias significativas entre analistas.

| Análisis de varianza de un factor (Datos emitidos utilizando excel) | | | | | | |
|---|-----------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------|---------------------|-----------------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> | | |
| Analista 1 | 10 | 20,451 | 2,045 | 0,015 | | |
| Analista 2 | 10 | 20,384 | 2,038 | 0,050 | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
| Entre grupos | 0,0002 | 1 | 0,0002 | 0,0069 | 0,934 | 4,414 |
| Dentro de los grupos | 0,5842 | 18 | 0,0325 | | | |
| Total | 0,5845 | 19 | | | | |
| Criterio de decisión: | | | | | | |
| Comparar el valor F calculado de para k-1 y n-k grados de libertad a un nivel de significancia $\alpha=0.05$. | | | | | | |
| Si $F > F_{\text{crítico}}$ Existen diferencias significativas entre las medias de los analistas, indicando que los datos no son lineales; en caso contrario las diferencias entre las medias de los analistas no son significativas, y los datos son lineales. | | | | | | |
| Conclusión: | | | | | | |
| F | Valor crítico para F | Diferencia Significativa | | | | |
| 0,007 | 4,41 | No hay diferencia significativa | | | | |

Tabla 7.13. Cálculo de los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos del nivel C (Análisis de Varianza).

| NIVEL C | | | | |
|---------|------------|------------|--|--|
| | Analista 1 | Analista 2 | | |
| 1 | 1,477 | 1,301 | | |
| 2 | 1,000 | 1,477 | | |
| 3 | 1,301 | 1,000 | | |
| 4 | 1,301 | 1,301 | | |
| 5 | 1,477 | 1,301 | | |
| 6 | 1,301 | 1,301 | | |
| 7 | 1,301 | 1,477 | | |

| Promedio | 1,31 | 1,31 | ECUACIONES | |
|--------------------------------|-------|-------|-----------------------|---|
| s | 0,159 | 0,159 | Desviación estándar | $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ |
| s ² | 0,025 | 0,025 | Varianza | $s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$ |
| n _{ij} | 6 | 6 | n _{ij} = n-1 | |
| n _{ij} s ² | 0,152 | 0,152 | | |

n= total réplicas= 7 p=total analistas=2

| ECUACIONES | | | | |
|-------------------------------|---|-------------------------|---------------------|----------------------------------|
| Fuente de variación | Suma de cuadrados (SS) | Grados de libertad (n) | Cuadrado medio (MS) | |
| Dentro-grupos SS _d | SS _d = $\sum n_i s_i^2$ | n _d = p(n-1) | MS _d = | SS _d / n _d |
| Total SS _t | SS _t = n _t s ² | n _t = pn-1 | | - |

| Muestra | Fuente de variación | Suma de cuadrados (SS) | Grados de libertad (n) | Cuadrados medios |
|-------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| Harina de camarón | Dentro-grupos SS _d | 0,305 | 18 | MS _d = 0,0254 |
| | Total SS _t | 0,305 | 19 | |

Tabla 7.14. Cálculo del %RSDIR =%CV los cuadrados medios entre-grupos y dentro-grupos del nivel C (Análisis de Varianza)

| | | | | |
|----------|---------------------|--------|------------------------|--|
| S_{IR} | Media (\bar{x}) | %RSDIR | $S_{IR} = \sqrt{MS_d}$ | $\%RSDIR = \frac{S_{IR}}{\bar{x}} * 100$ |
| 0,023 | 1,31 | 12,18 | | |

Tabla 7.15. Nivel C (Análisis de Varianza por solo factor Excel). Evaluación de diferencias significativas entre analistas

| Análisis de varianza de un factor (Datos emitidos utilizando excel) | | | | | | |
|---|----------------------|---------------------------------|---------------------------|-------------|--------------|----------------------|
| RESUMEN | | | | | | |
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza | | |
| Analista 1 | 7 | 9,158 | 1,308 | 0,025 | | |
| Analista 2 | 7 | 9,158 | 1,308 | 0,025 | | |
| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
| Entre grupos | 5,55112E-17 | 1 | 5,55112E-17 | 2,18747E-15 | 0,99999996 | 4,747 |
| Dentro de los grupos | 0,30452 | 12 | 0,02537692 | | | |
| Total | 0,30452 | 13 | | | | |
| Criterio de decisión: | | | | | | |
| Comparar el valor F calculado de para k-1 y n-k grados de libertad a un nivel de significancia $\alpha=0.05$. | | | | | | |
| Si $F > F_{\text{crítico}}$ Existen diferencias significativas entre las medias de los analistas, indicando que los datos no son lineales; en caso contrario las diferencias entre las medias de los analistas no son significativas, y los datos son lineales. | | | | | | |
| Conclusión: | | | | | | |
| F | Valor crítico para F | Diferencia Significativa | | | | |
| 2,18747E-15 | 4,747 | No hay diferencia significativa | | | | |

Resultados de Exactitud

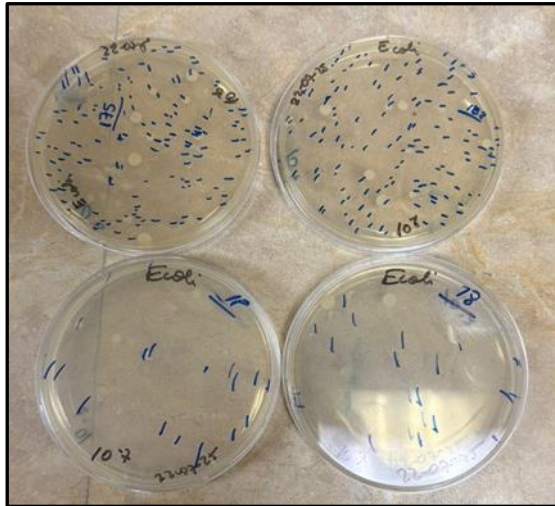


Figura 7.10. Fotos de siembra del inóculo inicial $1,5 \times 10^8$ UFC/ml para exactitud.

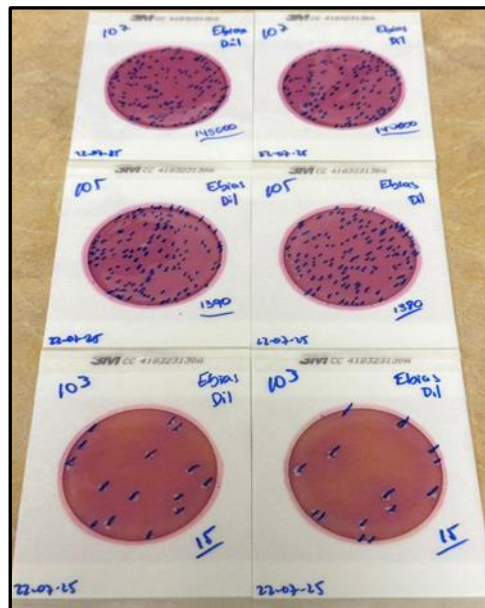


Figura 7.11. Fotos de siembra de inóculo evaluación de eBIAS.

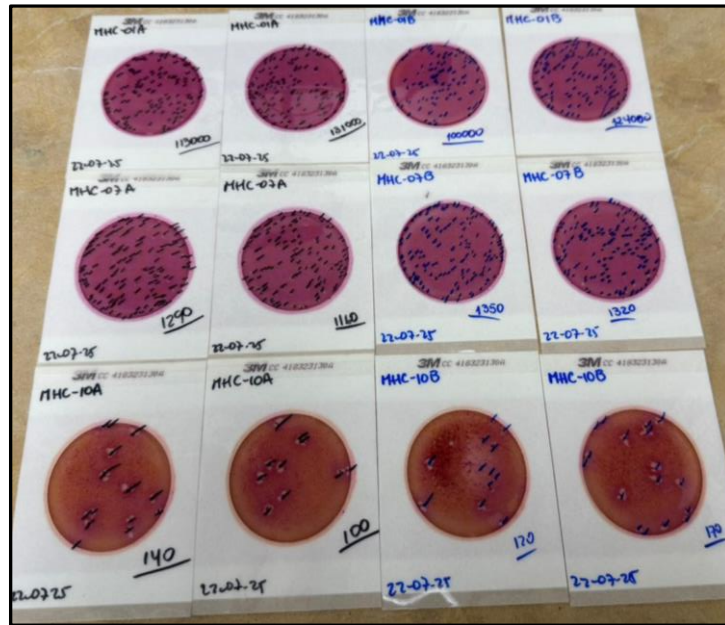


Figura 7.12. Fotos de siembra de muestra + inóculo evaluación de eBIAS.

Resultado de incertidumbre técnica

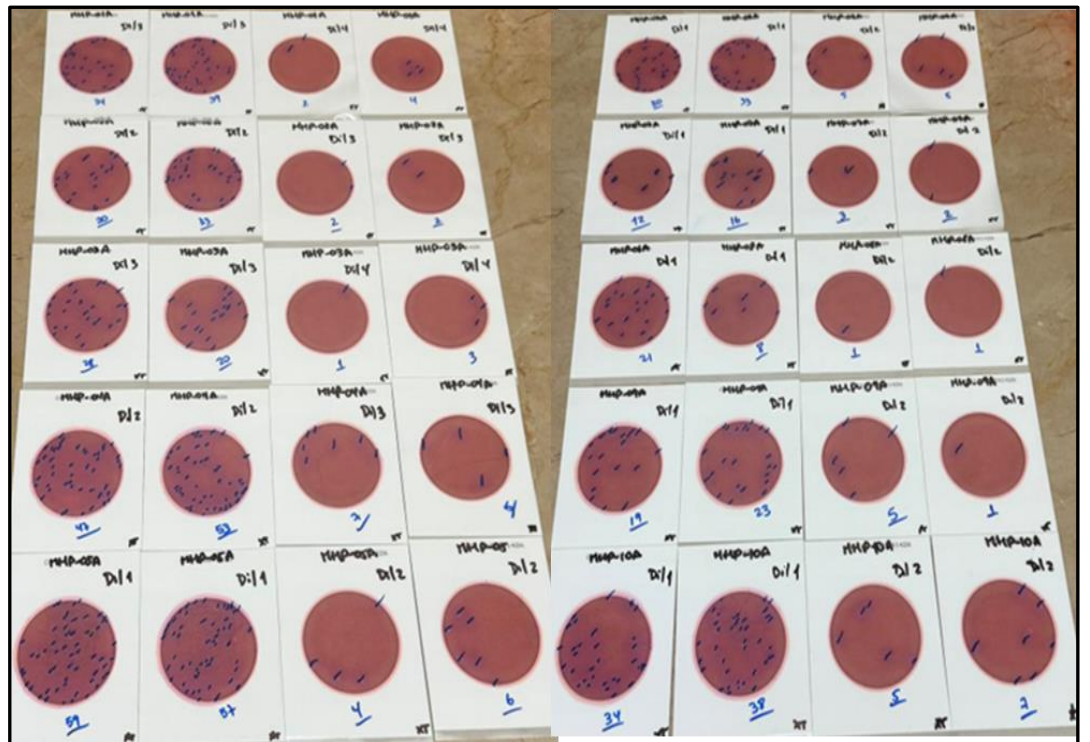


Figura 7.13. Fotos de siembra para cálculo de incertidumbre técnica porción A.

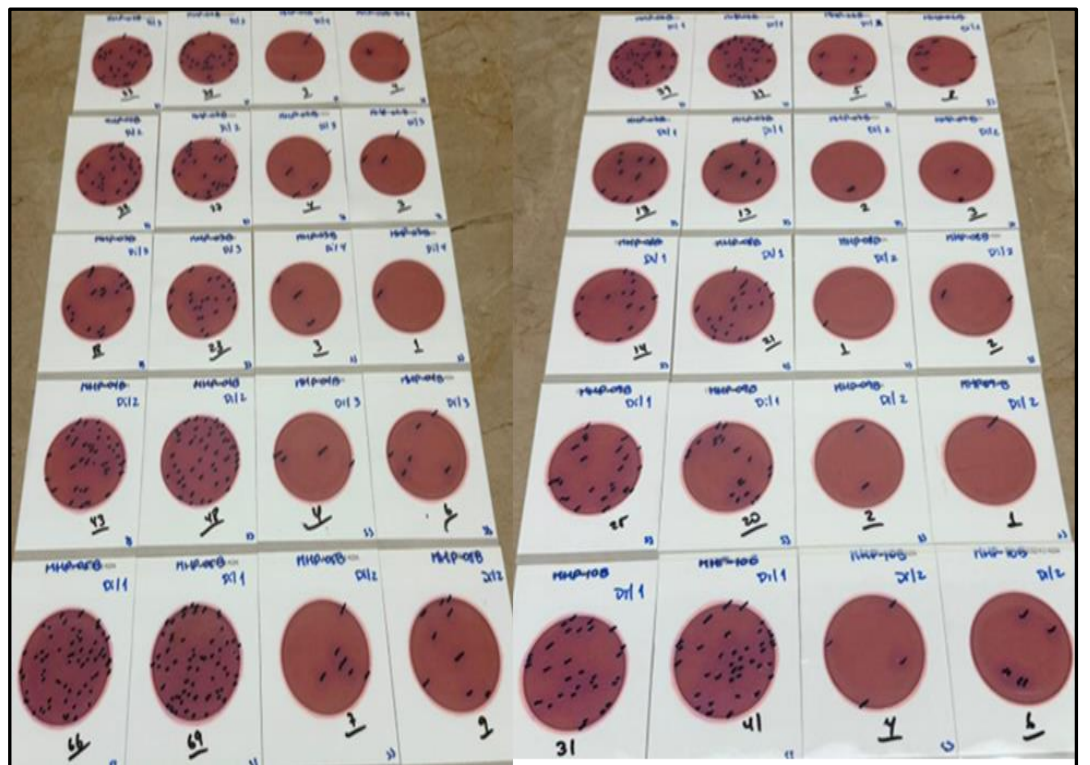


Figura 7.14. Fotos de siembra para cálculo de incertidumbre técnica porción B.



Figura 7.15. Fotos de siembra para cálculo de incertidumbre matriz

Resultado de Límite de Detección

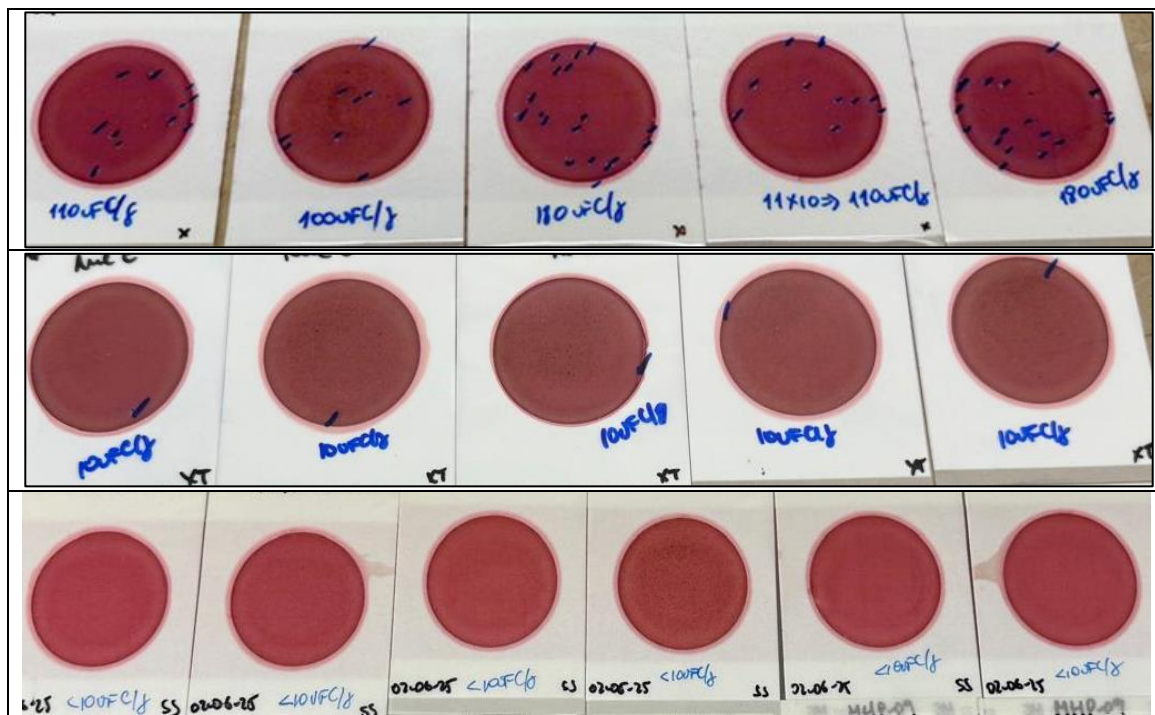


Figura 7 16. Fotos de siembra para determinar límite de detección.