



**Verificación del método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. basado en la ISO 6579 y del método horizontal para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos a 30 °C basado en la ISO 4833, en alimentos en el Laboratorio de Microbiología de Agrocalidad**

Cajas Rios, Olga Cristina

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel M. Sc.





30 de agosto de 2021



## Document Information

<b>Analyzed document</b>	Proyecto_Titulación_Cajas_Cristina_Verificación_Métodos_Microbiológicos_Para_Urkund.docx (D111833796)
<b>Submitted</b>	8/30/2021 3:18:00 PM
<b>Submitted by</b>	
<b>Submitter email</b>	biblioteca@espe.edu.ec
<b>Similarity</b>	1%
<b>Analysis address</b>	ilbbioteca.GDC@analysis.orkund.com

## Sources included in the report

<b>SA</b>	<b>Tesis Mikaela Celi URKUND PLAGIO.docx</b> Document Tesis Mikaela Celi URKUND PLAGIO.docx (D111487547)		2
<b>W</b>	URL: <a href="http://ohn.hondurascalidad.org/wp-content/uploads/2021/06/OHN-ISO-6579-1-2017-2019-12-10-Microbiol-cadena-alim-%E2%80%94-Part-1_Deteccion-Salmonella-spp_prev.pdf">http://ohn.hondurascalidad.org/wp-content/uploads/2021/06/OHN-ISO-6579-1-2017-2019-12-10-Microbiol-cadena-alim-%E2%80%94-Part-1_Deteccion-Salmonella-spp_prev.pdf</a> Fetched: 8/30/2021 3:19:00 PM		2
<b>W</b>	URL: <a href="https://pdfcoffee.com/iso-12-pdf-free.html">https://pdfcoffee.com/iso-12-pdf-free.html</a> Fetched: 8/30/2021 3:19:00 PM		2
<b>W</b>	URL: <a href="http://www.anmat.gov.ar/renalao/docs/analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_iii.pdf">http://www.anmat.gov.ar/renalao/docs/analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_iii.pdf</a> Fetched: 8/30/2021 3:19:00 PM		2

ALMA  
ROSEL  
KOCH  
KAISE  
R

Forma digitalmente  
con el código  
ALMA KAISE  
ROSEL KOCH  
KAISE R  
ALMA KAISE  
ROSEL KOCH  
KAISE R  
ALMA KAISE  
ROSEL KOCH  
KAISE R



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

### CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “**Verificación del método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. basado en la ISO 6579 y del método horizontal para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos a 30 °C basado en la ISO 4833, en alimentos en el Laboratorio de Microbiología de Agrocalidad**” fue realizado por la señorita **Cajas Rios, Olga Cristina** el mismo que ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 30 de agosto de 2021

Firma:

ALMA  
ROSEL  
KOCH  
KAISER

Firmado digitalmente  
por ALMA ROSEL KOCH  
KAISER  
DN: cn=ALMA ROSEL KOCH  
KAISER c=EC o=SECURITY  
DATA S. A. 2 o=ENTIDAD  
DE IDENTIFICACION DE  
INFORMACION  
Motivo: Estoy aprobando  
este documento  
Ubicación:  
Fecha: 2021-08-30  
12:24:05-00

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel M. Sc.

C. C.: 1708880792



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Cajas Rios, Olga Cristina**, con cédula de ciudadanía 1720522141, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Verificación del método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. basado en la ISO 6579 y del método horizontal para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos a 30 °C basado en la ISO 4833, en alimentos en el Laboratorio de Microbiología de Agrocalidad"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 30 de agosto de 2021

Firma

.....  
**Cajas Rios, Olga Cristina**

**C.C.: 1720522141**



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Yo **Cajas Rios, Olga Cristina**, con cédula de ciudadanía 1720522141, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Verificación del método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. basado en la ISO 6579 y del método horizontal para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos a 30 °C basado en la ISO 4833, en alimentos en el Laboratorio de Microbiología de Agrocalidad”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 30 de agosto de 2021

Firma

.....  
**Cajas Rios, Olga Cristina**

**C.C.: 1720522141**

**DEDICATORIA**

A la memoria de mi abuelo Luis Eduardo Cajas Toscano, quien estuvo presente desde mis primeros años de vida y siempre me alentó a continuar formándome profesionalmente.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por llenarme de bendiciones durante toda mi vida, por cada oportunidad para seguir creciendo principalmente como ser humano, por la salud para poder cumplir mis objetivos, por un día más de vida para intentar cambiar el mundo, por la fuerza para continuar en la lucha por mis sueños y por no permitirme perder la fe. También gracias por cada persona que ha cruzado en mi camino, y que ha sabido aportar en mi vida un aprendizaje.

A mis padres, por todos los valores y enseñanzas inculcados desde siempre, por su amor y apoyo incondicional en cada momento de mi formación personal, académica y profesional, por consolarme, aconsejarme y alentarme cuando las cosas se pusieron complicadas en el proceso. Por ser la principal inspiración y motivación para perseguir mis objetivos y ser una mejor persona cada día. Por todo el esfuerzo, sacrificio y paciencia que han puesto para que no nos falte nada a mi hermano y a mí. Cada éxito conseguido es de ustedes, los amo.

A mi hermano, por saber escuchar cuando los momentos de crisis existenciales se hacían presentes, por los consejos y su apoyo absoluto. Por ser mi compañero, cómplice y complemento de vida.

A mis tíos Alex y Karina, quienes con su hija Martina, han sabido ser como mis segundos padres y hermana, por estar siempre presentes con toda predisposición cuando he recurrido a ellos. Por su ánimo constante y confianza.

A Daniel Carrera, por toda la paciencia, consuelo y cariño brindado, incluso después de su graduación y aún con la distancia. Por ayudarme a crecer personalmente. Por acompañarme a entender que los obstáculos nos hacen más fuertes y que si nos caemos siete veces hay que levantarnos ocho. Muchas gracias.

A todos los muchachos que he conocido en mi paso por la Universidad, a quienes ahora considero amigos: Fabricio, Tania, Victor, Estefany, Alexis, Carolina y David. Han sabido escuchar

y brindarme su mano amiga y consejos en diferentes momentos. Espero no perder el contacto con ustedes nunca. De este grupo, debo agradecer especialmente a Fabricio, por su incondicional amistad desde que iniciamos en la aventura universitaria, gracias por siempre creer en mí; a Carolina, por haberme considerado cuando supo de una oportunidad en la empresa donde realizamos nuestro proyecto de titulación, gracias por la confianza; y a Tania, por brindarme su tan carismática amistad desde que nos conocimos en primer semestre hasta el día de hoy, gracias por el gran apoyo y complicidad en todo el proceso.

A mis amigos de la infancia y adolescencia: Michelle, Bryan Guillén, Michael, Bryan Basantes y David Proaño, quienes han sabido manifestar su compañía y palabras de aliento a pesar de la distancia que los diferentes caminos tomados nos han obligado a tener. Debo mencionar de manera muy especial a Michelle, por tantos años de amistad que se proyectan para muchos años más, por no faltar en los buenos y malos momentos.

A Alma Koch, por brindarme la oportunidad de seguir aprendiendo a su lado al permitirme ser pasante en el laboratorio que dirige y luego tesista en su rama de estudio. Por todo el apoyo que ha implicado el proceso de realización de mi proyecto de titulación en una institución externa, por animarme y encaminarme cuando las cosas se ponían complicadas, por brindarme la seguridad que necesitaba para enfrentar este reto.

A Patricia Jiménez, Isabel Ordoñez y Silvana Granda porque han sabido estar presentes de la manera más comedida en todo este camino.

A la empresa Agrocalidad y de manera muy especial a Jorge Irazábal, por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de titulación en el laboratorio que coordina, donde junto al analista Luis Jaramillo, supieron guiarme, enseñarme y permitirme experimentar hasta encontrar los mejores resultados durante todo el proceso de realización de mi proyecto de titulación.



**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<b>Índice de Tablas .....</b>	<b>14</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>16</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>19</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>20</b>
<b>Capítulo I: Introducción.....</b>	<b>21</b>
Antecedentes .....	21
Justificación e Importancia.....	22
Objetivos del trabajo de titulación .....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
Hipótesis .....	24
<b>Capítulo II: Marco referencial .....</b>	<b>25</b>
Agrocalidad .....	25
Laboratorio de microbiología .....	25
Inocuidad alimentaria .....	25
Verificación de métodos microbiológicos .....	26
Términos usados en el proceso de verificación.....	27
Laboratorio usuario.....	27

	10
Alcance del método. ....	27
Alcance de la validación. ....	27
Alcance de laboratorio de aplicación. ....	28
Porción de ensayo. ....	28
Requisitos para verificar un método .....	28
Selección del método. ....	28
Requisitos relacionados a recursos. ....	28
Personal. ....	28
Instalaciones y condiciones ambientales. ....	29
Equipamiento. ....	29
Productos y servicios suministrados externamente. ....	29
Métodos que pueden someterse a verificación .....	29
Métodos de referencia. ....	29
Métodos alternativos validados. ....	30
Tipos de métodos microbiológicos y características de desempeño .....	30
Métodos cualitativos. ....	30
Límite de detección estimado (eLOD <sub>50</sub> ). ....	30
Métodos cuantitativos. ....	31
Desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (S <sub>IR</sub> ). ....	31
Sesgo estimado (eBias). ....	31
Etapas de la verificación. ....	31
Verificación de implementación. ....	31

	11
Verificación de productos. ....	32
Alcance para una “amplia gama de alimentos”. ....	32
Alcance para una “gama limitada de alimentos”. ....	32
Alcance para una “amplia gama de alimentos y otras categorías”. ....	32
Microorganismos utilizados en el estudio .....	33
Cepas de referencia .....	33
Aerobios mesófilos.....	33
<i>Escherichia coli</i> .....	34
<i>Salmonella enterica</i> .....	34
<i>Staphylococcus epidermidis</i> . ....	35
Normativa .....	35
ISO/IEC 17025 .....	36
ISO 16140-3.....	36
ISO 6579-1.....	37
ISO 4833-1.....	37
UNE EN ISO 7218.....	37
UNE EN ISO 11133.....	38
ISO 6887-1.....	38
<b>Capítulo III: Metodología.....</b>	<b>40</b>
Verificación del funcionamiento de recursos .....	40
Verificación de equipos .....	40

	12
Verificación de medios de cultivo .....	42
Solución salina.....	42
Agua peptona tamponada .....	43
Caldo Muller-Kauffman Tetrionato Novobiocina (Caldo MKTTn).....	43
Agar Semisólido Modificado Rapaport Vasiliadis (Agar MSRv) .....	44
Agar urea.....	44
Control de ambientes.....	45
Obtención de muestras.....	45
Ensayo de desinfección/esterilización de muestras .....	46
Preparación de inóculos.....	47
Inóculos para el ensayo de verificación del método cuantitativo .....	47
Inóculos para el ensayo de verificación del método cualitativo .....	48
Protocolo de verificación del método cuantitativo para el conteo de aerobios mesófilos, según ISO 4833.....	48
Verificación de implementación.....	48
Verificación de productos .....	50
Protocolo de verificación del método cualitativo para la detección de <i>Salmonella</i> spp. ....	51
Análisis estadístico .....	53
<b>Capítulo IV: Resultados .....</b>	<b>54</b>
Verificación de recursos .....	54
Verificación de equipos.....	54

Verificación de medios de cultivo .....	61
Solución salina.....	61
Agua peptona tamponada. ....	62
Caldo Muller-Kauffman Tetrionato Novobiocina (Caldo MKTTn).....	63
Agar Semisólido Modificado Rapapport-Vasiliadis (Agar MSRV).....	64
Agar urea.....	65
Control de ambientes.....	66
Ensayo de desinfección/esterilización de alimentos .....	67
Verificación del método horizontal para recuento de aerobios mesófilos totales a 30 °C.....	68
Verificación de implementación.....	68
Verificación de productos .....	70
Verificación del método horizontal para la detección de <i>Salmonella</i> spp.....	72
Verificación de implementación.....	72
Verificación de productos .....	76
<b>Capítulo V: Discusión .....</b>	<b>86</b>
<b>Capítulo VI: Conclusiones .....</b>	<b>97</b>
<b>Capítulo VII: Recomendaciones .....</b>	<b>98</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>99</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Tipos de alimentos a ensayar en estudios de verificación .....</i>	<b>32</b>
<b>Tabla 2</b> <i>Número de productos a ensayar en la verificación de productos .....</i>	<b>33</b>
<b>Tabla 3</b> <i>Puntuación para la turbidez de medios líquidos .....</i>	<b>43</b>
<b>Tabla 4</b> <i>Alimentos usados en el ensayo de verificación de los métodos microbiológicos seleccionados .....</i>	<b>46</b>
<b>Tabla 5</b> <i>Alternativa para lograr los niveles de inoculación en las porciones de ensayo .....</i>	<b>48</b>
<b>Tabla 6</b> <i>Número de repeticiones por nivel de inoculación para el método cualitativo .....</i>	<b>51</b>
<b>Tabla 7</b> <i>Resumen de la distribución de calor en el baño termostático .....</i>	<b>58</b>
<b>Tabla 8</b> <i>Resultados del ensayo de repetibilidad de la balanza .....</i>	<b>59</b>
<b>Tabla 9</b> <i>Resultados del ensayo de excentricidad de la balanza .....</i>	<b>60</b>
<b>Tabla 10</b> <i>Resultados del indicador químico para el autoclave.....</i>	<b>60</b>
<b>Tabla 11</b> <i>Resultados del conteo de microorganismos en solución salina .....</i>	<b>62</b>
<b>Tabla 12</b> <i>Resultado comparativo del contenido microbiano en los alimentos antes y después de ser esterilizados.....</i>	<b>68</b>
<b>Tabla 13</b> <i>Resultados del proceso de verificación de implementación del método cuantitativo....</i>	<b>69</b>
<b>Tabla 14</b> <i>Resultado del procedimiento de verificación de productos .....</i>	<b>71</b>

**Tabla 15** *Resultados para la verificación de implementación en la detección de Salmonella spp.* **75**

**Tabla 16** *Resultados de la verificación de productos para la detección de Salmonella spp.: ajo.* **83**

**Tabla 17** *Resultados de la verificación de productos para la detección de Salmonella spp.: frutilla*  
..... **83**

**Tabla 18** *Resultados en la verificación de productos para la detección de Salmonella spp.: pienso*  
..... **84**

**Tabla 19** *Resumen de resultados para la detección de Salmonella spp. en la verificación de*  
*productos* ..... **84**

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> <i>Puntos de medición de temperatura en el baño termostático</i> .....	<b>41</b>
<b>Figura 2</b> <i>Orden de los puntos de medición para el ensayo de excentricidad</i> .....	<b>41</b>
<b>Figura 3</b> <i>Gráfico de control del congelador</i> .....	<b>55</b>
<b>Figura 4</b> <i>Gráfico de control del refrigerador para medios de cultivo</i> .....	<b>55</b>
<b>Figura 5</b> <i>Gráfico de control para el refrigerador de muestras</i> .....	<b>56</b>
<b>Figura 6</b> <i>Gráfico de control de incubadora programada para funcionar a 30 °C</i> .....	<b>57</b>
<b>Figura 7</b> <i>Gráfico de control de incubadora programada para funcionar a 37 °C</i> .....	<b>57</b>
<b>Figura 8</b> <i>Gráfico de control de incubadora programada para funcionar a 41.5 °C</i> .....	<b>58</b>
<b>Figura 9</b> <i>Tinción Gram de los cultivos frescos preparados</i> .....	<b>61</b>
<b>Figura 10</b> <i>Evaluación de la turbidez en agua peptona tamponada</i> .....	<b>63</b>
<b>Figura 11</b> <i>Confirmación de presencia de microorganismos objetivos en caldo MKTTn</i> .....	<b>63</b>
<b>Figura 12</b> <i>Confirmación de inhibición de microorganismos no objetivos en caldo MKTTn</i> .....	<b>64</b>
<b>Figura 13</b> <i>Confirmación de presencia de microorganismo objetivo en agar MSRv</i> .....	<b>64</b>
<b>Figura 14</b> <i>Confirmación de inhibición de microorganismo no objetivo en agar MSRv</i> .....	<b>65</b>
<b>Figura 15</b> <i>Confirmación de funcionamiento del medio agar urea</i> .....	<b>65</b>
<b>Figura 16</b> <i>Gráfico de control de ambiente</i> .....	<b>66</b>



<b>Figura 17</b> <i>Control microbiológico en área de pesaje, preparación de medios y lavado, y cabinas de bioseguridad</i> .....	<b>67</b>
<b>Figura 18</b> <i>Alimentos esterilizados</i> .....	<b>68</b>
<b>Figura 19</b> <i>Resultado del enriquecimiento selectivo en agar MSRV</i> .....	<b>72</b>
<b>Figura 20</b> <i>Cultivos puros obtenidos de la fase de aislamiento selectivo para la detección de Salmonella spp. en la verificación de implementación</i> .....	<b>73</b>
<b>Figura 21</b> <i>Pruebas bioquímicas para detección de Salmonella spp. en verificación de implementación</i> .....	<b>74</b>
<b>Figura 22</b> <i>Resultado del enriquecimiento selectivo en agar MSRV: ajo</i> .....	<b>76</b>
<b>Figura 23</b> <i>Resultado del enriquecimiento selectivo en agar MSRV: frutilla</i> .....	<b>77</b>
<b>Figura 24</b> <i>Resultado del enriquecimiento selectivo en agar MSRV: pienso</i> .....	<b>77</b>
<b>Figura 25</b> <i>Cultivos puros obtenidos de la fase de aislamiento selectivo para la detección de Salmonella spp. en la verificación de productos: ajo</i> .....	<b>78</b>
<b>Figura 26</b> <i>Cultivos puros obtenidos de la fase de aislamiento selectivo para la detección de Salmonella spp. en la verificación de productos: frutilla</i> .....	<b>78</b>
<b>Figura 27</b> <i>Cultivos puros obtenidos de la fase de aislamiento selectivo para la detección de Salmonella spp. en la verificación de productos: pienso</i> .....	<b>79</b>
<b>Figura 28</b> <i>Pruebas bioquímicas para detección de Salmonella spp. en verificación de productos: ajo</i> .....	<b>80</b>

**Figura 29** *Pruebas bioquímicas para detección de Salmonella spp. en verificación de productos:*

*frutilla* ..... **81**

**Figura 30** *Pruebas bioquímicas para detección de Salmonella spp. en verificación de productos:*

*pienso* ..... **82**

## Resumen

En el sector alimenticio, la aplicación de métodos microbiológicos de referencia aumenta la confiabilidad de los resultados que los laboratorios proporcionan. Su ejecución implica protocolos que permiten comprobar la competencia técnica de un laboratorio, considerando las constantes actualizaciones. En este trabajo se expone la implementación de dos métodos de referencia en el laboratorio de microbiología de alimentos en Agrocalidad, para convertirlo en sujeto de acreditación a través de la ISO/IEC 17025. El estudio incluyó la comprobación del funcionamiento de equipos, el rendimiento de medios de cultivo y la verificación de los métodos, apoyándose en normas complementarias. La verificación de los métodos comprendió el procedimiento planteado en la ISO 16140-3, que implica la verificación de implementación y de productos, considerando características de desempeño diferentes para métodos cuantitativos o cualitativos. En el ensayo cuantitativo para el conteo de aerobios mesófilos basado en la ISO 4833-1 se determinó un valor  $S_{IR} = 0.18$  en pollo durante la verificación de implementación; y valores de eBias inferiores a  $0.5 \log_{10}$  en ajos, frutillas y piensos durante la verificación de productos. En el ensayo cualitativo para la detección de *Salmonella* spp. basado en la ISO 6579-1 se determinó un  $eLOD_{50} = 2.22$  UFC/porción de ensayo en pollo durante la verificación de implementación, y valores de  $<0.89$ ,  $0.44$  y  $<0.89$  UFC/porción de ensayo en ajos, frutillas y piensos, respectivamente en la verificación de productos. Los métodos se verificaron por el cumplimiento de los límites de aceptabilidad de todas las características de desempeño.

Palabras clave:

- **VERIFICACIÓN**
- **MÉTODOS DE REFERENCIA**
- **CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO**
- **ALIMENTOS**

### Abstract

In the food industry, the application of microbiological reference methods increases the reliability of the results provided by laboratories. Their implementation involves protocols that allow checking the technical competence of a laboratory, considering the constant updates. This research study describes the implementation of two reference methods in the food microbiology laboratory at Agrocalidad, in order to make it subject to accreditation through ISO/IEC 17025. The study included the checking of equipment operation, the culture media performance and the methods verification, supported by complementary standards. Method verification comprised the procedure outlined in ISO 16140-3, which involves implementation verification and (food) item verification, considering different performance characteristics for quantitative or qualitative methods. In the quantitative assay for mesophilic aerobic count based on ISO 4833-1, a value of  $S_{IR} = 0.18$  was determined in poultry during implementation verification; and eBias values lower than  $0.5 \log_{10}$  in garlic, strawberries and pellets during (food) item verification. In the qualitative assay for the detection of *Salmonella* spp. based on ISO 6579-1, an  $eLOD_{50} = 2.22$  CFU/test portion in poultry was determined during implementation verification, and values of <0.89, 0.44 and <0.89 CFU/test portion in garlic, strawberries and pellets, respectively in (food) item verification. Methods were verified for compliance with acceptability limits for all performance characteristics.

Key words:

- **VERIFICATION**
- **REFERENCE METHODS**
- **PERFORMANCE CHARACTERISTICS**
- **FOOD**

## Capítulo I: Introducción

### Antecedentes

Existe gran variedad de sistemas de gestión de calidad, donde los laboratorios pueden seleccionar al que mejor se acoplen, según sus características y necesidades. Generalmente, estos se adaptan a normas y organismos internacionales como la Organización Internacional de Normalización (ISO, por sus siglas en inglés) o en Ecuador a las del Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN) que desde 2016 forma parte del Consejo Directivo de la ISO y ya cuenta con varias normas adoptadas de ella, en español (Servicio Ecuatoriano de Normalización [INEN], 2007).

En Ecuador, los procesos de verificación de métodos se han ido extendiendo, principalmente para la obtención de acreditaciones, pues garantizan la capacidad de un laboratorio para proporcionar resultados confiables mediante la aplicación de normativas nacionales o internaciones vigentes. Laboratorios como: GAIALABS, MicroBioBase, Multianálityca Cía. Ltda., que disponen de servicios para el análisis microbiológico de alimentos, ya cuentan con una acreditación en varios de los ensayos que realizan, otorgada por el Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE) (Servicio de Acreditación Ecuatoriano [SAE], 2020), la cual avala el cumplimiento de los requisitos planteados en la norma ISO/IEC 17025, asociados a la verificación de métodos, para garantizar la competencia técnica de laboratorios de ensayo y calibración (ISO Tv Intercontinental, 2019). Del mismo modo, existen varios laboratorios ofreciendo este tipo de servicios sin contar con una acreditación, a pesar de cumplir con los mismos requerimientos. Uno de ellos es el laboratorio de Microbiología de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario – AGROCALIDAD, donde se llevan a cabo varios ensayos, entre ellos el de ausencia/presencia de *Salmonella* spp. y el conteo de aerobios mesófilos totales tanto en placa petrifilm como en cultivo en placa, ambos con protocolos bien

establecidos apoyados en normativas nacionales INEN, basadas en normativas internacionales ISO. Sin embargo, las normas se han actualizado y cuentan con modificaciones que aún no han sido incorporadas en los ensayos rutinarios, por lo que se ve la necesidad de verificar la implementación de los métodos de referencia elegidos y así incrementar la confiabilidad del laboratorio en cuanto a los resultados que presenta, además de convertirlo en sujeto para una acreditación en la aplicación de los mismos.

La ejecución de estos métodos también garantiza inocuidad alimentaria, evitando así cifras alarmantes, ya que aproximadamente 600 millones de personas a nivel mundial se enferman anualmente y al menos 420 000 pierden la vida por el consumo de alimentos contaminados, siendo los niños de hasta 5 años de edad los más afectados. Además, se evitaría una pérdida económica de aproximadamente 110 000 millones de dólares anuales en productividad y gastos médicos (OMS, 2020).

### **Justificación e Importancia**

La verificación de métodos microbiológicos como herramienta de control de calidad se utiliza en diferentes áreas como la industria alimenticia, farmacéutica o cosmética, con la misma importancia, pero ajustándose al cumplimiento de diferentes parámetros. Para que dichos procesos brinden resultados más confiables, tanto los laboratorios como los métodos llevados a cabo en sus instalaciones deben asegurar la certeza de los resultados, considerando el máximo nivel permitido por el desarrollo científico y técnico. Por ello, se recomienda evaluar previamente la capacidad de los laboratorios para poner en marcha un ensayo específico (Camaró Sala et al., 2013).

La importancia de verificar la implementación de un método radica en el avance de la tecnología, pues a la par se van desarrollando y actualizando las técnicas y equipos analíticos utilizados en los laboratorios, aumentando las exigencias, por lo que es necesario realizar

ensayos incluyendo los nuevos conocimientos para determinar si cumplen o no con lo previsto. Los resultados obtenidos deben ser comparables, independientemente del laboratorio donde se apliquen los métodos, por ello, el empleo de métodos normalizados suele usarse como herramienta eficaz para obtener garantías (Camaró Sala et al., 2013).

Otro aspecto importante al momento de realizar una verificación, es el interés de los profesionales por garantizar la calidad en los procesos y resultados que proporcionan, brindando a los clientes seguridad del producto manejado en el sentido de inocuidad (Camaró Sala et al., 2013), pues se sabe que todos los alimentos poseen flora microbiana natural, sin embargo, es importante hacer su identificación y/o cuantificación para llevar un control de los mismos y colaborar en su calidad y tiempo de vida útil, evitando así posibles infecciones en humanos y animales (Tranchard, 2016).

### **Objetivos del trabajo de titulación**

#### ***Objetivo general***

Verificar la implementación del método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. basado en la ISO 6579 y del método horizontal para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos a 30 °C basado en la ISO 4833, en alimentos en el Laboratorio de Microbiología de Agrocalidad.

#### ***Objetivos específicos***

- Implementar el método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. basado en la ISO 6579-1 en diferentes alimentos.
- Implementar el método horizontal para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos a 30 °C basado en la ISO 4833-1 en diferentes alimentos.
- Determinar las características de desempeño de ambos métodos.

**Hipótesis**

Las características de desempeño obtenidas garantizan la verificación del método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. basado en la ISO 6579 y del método horizontal para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos a 30 °C basado en la ISO 4833 aplicados en alimentos en el Laboratorio de Microbiología de Agrocalidad.



## Capítulo II: Marco referencial

### **Agrocalidad**

La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario – Agrocalidad, es una empresa pública que forma parte del Ministerio de Agricultura y Ganadería, encargada de controlar y regular procedimientos para la protección y mejoramiento de la sanidad en el sector agropecuario y la inocuidad alimentaria en la producción primaria, brindando así servicios de calidad a todos los productores del país (Agrocalidad, s. f.-a).

### ***Laboratorio de microbiología***

El laboratorio pertenece a la Dirección de Diagnóstico de Inocuidad de los Alimentos y Control de Insumos Agropecuarios, y es el encargado de brindar un diagnóstico acertado y oportuno de la calidad microbiológica de los alimentos provenientes de la etapa primaria de producción, como: vegetales, frutas, carnes, balanceados, piensos, agua, entre otros, asegurando así su inocuidad, al aplicar ensayos basados en normativas nacionales e internacionales (Agrocalidad, s. f.-b).

### ***Inocuidad alimentaria***

La inocuidad alimentaria constituye una responsabilidad por parte de todos los que conforman la cadena alimenticia, empezando desde la etapa de producción primaria, pasando por los comerciantes, hasta su llegada a los consumidores (Bordetas, 2004), puesto que los microorganismos contaminantes pueden hacerse presentes en cualquiera de ellas.

En este sentido, desde el año 2019 Agrocalidad ha ido fomentando la certificación en Buenas Prácticas Agropecuarias (BPA) para los trabajadores del sector agropecuario, ya que son el primer eslabón de la cadena alimentaria. Las BPA permiten la obtención de alimentos seguros, protegen la salud del trabajador del campo, cuidan el medio ambiente y el bienestar animal, con lo que se obtiene un valor agregado en el producto primario y se contribuye con la

seguridad alimentaria tanto para humanos como para animales (Agrocalidad, 2020). Asimismo, se alienta a los consumidores a seguir los pasos claves para la inocuidad de los alimentos: limpiar, separar, cocinar y enfriar, para evitar enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018a).

Este año, Agrocalidad se encuentra formando parte de un proyecto que fortalecerá el Sistema Nacional de Inocuidad Alimentaria, basándose en la experiencia y modelo de gestión de la Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria (ACHIPIA), con esto, la agencia fortalecerá la calidad de los alimentos en Ecuador, poniendo a disposición de la población una variedad de productos inocuos, además de promocionar la competitividad del sector productor de alimentos (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2021).

#### **Verificación de métodos microbiológicos**

El concepto de verificación se encuentra estrechamente relacionado con el concepto de validación, pero no hay que confundirlos puesto que se aplican en métodos diferentes. Según la (Organización Internacional de Normalización [ISO], 2015), la verificación es la “confirmación, mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos establecidos”, mientras que la validación es la “confirmación, mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista”.

La principal diferencia entre los términos radica en el tipo de método al que se aplica, la verificación se usa exclusivamente para la implementación de aquellos previamente validados, como: métodos de referencia, métodos oficiales o métodos de organizaciones nacionales o internacionales reconocidas; mientras que la validación se usa para otros métodos (Camaró Sala et al., 2013). En otras palabras, la verificación implica demostrar la capacidad de un laboratorio

para ejecutar correctamente un método de referencia cuando se lo utiliza exactamente como se encuentra descrito en una norma (Arriola, 2012).

La verificación de métodos microbiológicos se encuentra asociada a la norma internacional ISO/IEC 17025, y dentro del enfoque alimentario, se ha publicado recientemente la norma ISO 16140-3 que trae consigo una guía para facilitar este proceso, cumpliendo con los requerimientos de la norma ISO/IEC 17025, independientemente de si se quiere o no adquirir una certificación en el método aplicado.

El laboratorio debe asegurarse de poder llevar a cabo de forma correcta los métodos de referencia seleccionados y de que los criterios de desempeño puedan ser satisfechos antes de introducir el ensayo con propósitos de rutina (Arriola, 2012). Después de haber culminado con un proceso de verificación, el laboratorio en cuestión deberá repetir periódicamente el ensayo realizado para comprobar el cumplimiento de los parámetros de estudio documentados (Silva & García, 2006). La verificación también deberá repetirse en caso de que el método de referencia haya sido modificado por el organismo que lo publicó (ISO/IEC, 2017).

### ***Términos usados en el proceso de verificación***

La nueva norma ISO 16140-3, utiliza diferentes términos a lo largo de su redacción, mismos que deben ser explicados para un correcto entendimiento de la metodología. A continuación, se describen los más importantes:

**Laboratorio usuario.** Cualquier laboratorio que aplique un método de referencia o método alternativo validado.

**Alcance del método.** Hace referencia a las categorías, matrices, analitos y concentraciones para los que se afirma que un método es aplicable.

**Alcance de la validación.** Hace referencia a las categorías, matrices, analitos y concentraciones para los que se afirma que la aplicabilidad de un método está validada.

**Alcance de laboratorio de aplicación.** Hace referencia a las categorías, matrices, analitos y concentraciones para los que un laboratorio usuario afirma ser capaz de aplicar de forma satisfactoria.

**Porción de ensayo.** Es una muestra representativa que se toma de una muestra de laboratorio y se utiliza en la preparación de la suspensión inicial. Puede medirse en masa o volumen.

### ***Requisitos para verificar un método***

**Selección del método.** Antes de iniciar con un proceso de verificación, es necesario tomar en cuenta ciertos aspectos. La elección del método es importante, ya que se deben incluir métodos que vayan de acuerdo con el alcance de las actividades del laboratorio, contemplando los recursos disponibles, además de considerar si el método de ensayo es adecuado para un producto específico (Arriola, 2012).

**Requisitos relacionados a recursos.** Se consideran varios puntos mencionados a continuación:

**Personal.** Para que la verificación sea aplicada correctamente, se requiere cierto nivel de conocimiento y experiencia por parte de quien realice el procedimiento. El laboratorio debe contar con personal capacitado para cumplir con las diferentes actividades que allí se desarrollen, además de tener implementados procedimientos y llevar registros relacionados con los requisitos de competencia, selección, formación, supervisión y autorización del personal (ISO/IEC, 2017).

La autorización de actividades puede demostrarse mediante evidencias como informes de validación o implementación de métodos de ensayo (Servicio de Acreditación Ecuatoriano [SAE], 2019).

**Instalaciones y condiciones ambientales.** Las instalaciones y condiciones ambientales del laboratorio deben ser adecuadas para la realización de las diferentes actividades, evitando que afecten adversamente la validez de los resultados. Se deben hacer seguimientos y revisiones periódicas, con los respectivos registros (ISO/IEC, 2017).

**Equipamiento.** El laboratorio debe tener acceso a todo el equipamiento que le permita un correcto desempeño de sus actividades sin influir en los resultados. También deberá manejar procedimientos de manipulación, transporte, almacenamiento, uso y mantenimiento que aseguren su correcto funcionamiento y evite su contaminación y/o deterioro temprano. Los equipos deberán verificarse antes de instalarse, reinstalarse o ser utilizados en ensayos que establezcan requisitos especificados, llevando los registros correspondientes (ISO/IEC, 2017).

**Productos y servicios suministrados externamente.** En caso de requerir productos o servicios externos como: patrones y equipos de medición, materiales de referencia, servicios de calibración, muestreo, ensayo, auditorías, mantenimiento de instalaciones y equipos; los laboratorios deben informar sobre sus requerimientos, criterios de aceptación y otros aspectos que consideren importantes, y conservar registros de los mismos (ISO/IEC, 2017).

En caso de que estos productos o servicios sean proporcionados para llevar a cabo actividades que proporcionen resultados con fines de acreditación, deberán ser suministrados por un proveedor acreditado por el SAE u otro organismo de acreditación con que el SAE tenga firmado un acuerdo de reconocimiento (IAAC o ILAC) para los ensayos, calibraciones o muestreos suministrados (SAE, 2019).

#### ***Métodos que pueden someterse a verificación***

**Métodos de referencia.** Métodos que han sido desarrollados por organismos de normalización u otro organismo reconocido, cuyos procedimientos se encuentran bien definidos y se aplican tal cual lo dispone la norma (Velasco, 2017). Al ser implementados en un

laboratorio, requieren de la verificación de su correcta aplicación sin necesidad de un análisis exhaustivo en cuanto a sus características de desempeño, y son utilizados para evaluar métodos alternativos (Camaró Sala et al., 2013). Su desarrollo incluye un proceso de validación (Arriola, 2012).

**Métodos alternativos validados.** Métodos que, al ser aplicados sobre una categoría determinada de productos, permiten la detección o cuantificación del mismo analito que el método de referencia correspondiente. Deben contar con estudios intralaboratorio y al menos un estudio interlaboratorio (ISO, 2021). Generalmente constituyen una alternativa rápida pero eficaz de un método (Velasco, 2017). Su validación se realiza por comparación con un método de referencia correspondiente (Camaró Sala et al., 2013).

#### ***Tipos de métodos microbiológicos y características de desempeño***

**Métodos cualitativos.** Pretenden detectar la presencia o ausencia de un microorganismo determinado en una muestra. Durante un proceso de validación, las características de desempeño más importantes a considerar son: límite de detección, sensibilidad, especificidad, precisión relativa, desviación positiva, desviación negativa, repetibilidad y reproducibilidad (Soledad, 2009). Para un proceso de verificación, solo se requiere determinar el límite de detección estimado ( $eLOD_{50}$ , por sus siglas en inglés) (ISO, 2021).

**Límite de detección estimado ( $eLOD_{50}$ ).** Corresponde a una estimación de la concentración expresada en UFC/porción de ensayo, para la que la probabilidad de detección es del 50 % (Jacobs et al., 2015). Se denomina “estimado” debido a que el diseño experimental planteado para su determinación considera un número de muestras pequeño en comparación con los estudios de validación (ISO, 2021).

**Métodos cuantitativos.** Tiene como objetivo encontrar un valor numérico de un microorganismo de estudio presente en una muestra (Camaró Sala et al., 2013). Al realizar una validación, las características de desempeño a tomar en consideración son: límite de cuantificación, sensibilidad, especificidad, precisión relativa, desviación positiva, desviación negativa, repetibilidad y reproducibilidad (Silva & García, 2006). Cuando se realiza un ensayo de verificación se determina la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio ( $S_{IR}$ ) y el sesgo estimado ( $eBias$ ).

**Desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio ( $S_{IR}$ ).** Permite obtener la desviación estándar de las repeticiones realizadas en un mismo laboratorio y aplicando un mismo método, bajo condiciones de reproducibilidad (The International Organisation of Vine and Wine [OIV], 2005). Corresponde a la determinación de la incertidumbre técnica. En conjunto con la incertidumbre matricial y distributiva se describen en la norma ISO 19036, cuando su cálculo se amerita (ISO, 2021).

**Sesgo estimado ( $eBias$ ).** Implica la estimación de un error sistemático de medición, o una diferencia sistemática entre un valor cuantitativo de referencia y la media de los resultados de las réplicas de medición. Su valor se considera “estimado” por incluir un reducido número de muestras (ISO, 2021).

### ***Etapas de la verificación***

**Verificación de implementación.** Verificar la implementación del método seleccionado en el laboratorio usuario es el primer paso, pues es donde se demuestra realmente la competencia del laboratorio para aplicar un método que ya se encuentra validado. Para ello es necesario revisar los estudios de validación del método, que por lo general están disponibles en la misma normativa, y de acuerdo a eso seleccionar un alimento de ensayo, según lo descrito en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Tipos de alimentos a ensayar en estudios de verificación*

<b>Tipo de método</b>	<b>Alimento de ensayo</b>
<b>Métodos cualitativos</b>	Alimento ensayado en el estudio de validación del método.
<b>Métodos cuantitativos</b>	Cualquier producto que pertenezca al alcance de la validación del método, sin que haya sido analizado necesariamente.

**Verificación de productos.** La verificación de productos constituye el segundo paso y es donde se demuestra la competencia del laboratorio usuario para poner en marcha el método validado seleccionado con productos que maneja rutinariamente.

Los alimentos a ensayar en esta etapa se seleccionan considerando el alcance de la validación en el método seleccionado. En este sentido se debe marcar una división según el número de alimentos que hayan sido probados en el estudio de validación:

***Alcance para una “amplia gama de alimentos”.*** El estudio de validación incluye cinco o más categorías de alimentos probadas, por lo que el laboratorio usuario deberá seleccionar mínimo cinco productos alimenticios desafiantes de categorías diferentes probadas o no, que pertenezcan al alcance del laboratorio de aplicación.

***Alcance para una “gama limitada de alimentos”.*** El estudio de validación incluye menos de cinco categorías de alimentos probadas, por lo que el laboratorio usuario deberá escoger al menos un producto alimenticio desafiante de categorías diferentes probadas, que pertenezcan al alcance del laboratorio de aplicación.

***Alcance para una “amplia gama de alimentos y otras categorías”.*** El estudio de validación incluye cinco o más categorías de alimentos y además otras categorías probadas durante el proceso de validación, por lo que el laboratorio usuario deberá escoger al menos cinco productos alimenticios desafiante de categorías diferentes probadas o no, que



pertenezcan al alcance del laboratorio de aplicación y adicionalmente, se seleccionará un producto de cada una de esas otras categorías que correspondan al alcance del laboratorio usuario.

Un resumen de lo mencionado se expresa en la Tabla 2, donde se incluye un alcance más en caso de una validación para una gama limitada de alimentos y otras categorías.

**Tabla 2**

*Número de productos a ensayar en la verificación de productos*

<b>Alcance de la validación</b>	<b>Número de productos</b>
“Amplia gama de alimentos”	$\geq 5$
“Gama limitada de alimentos”	$\leq 4$
“Amplia gama de alimentos y otras categorías”	$\geq 5 + 1$ producto de cada una de las otras categorías
“Gama limitada de alimentos y otras categorías”	$\leq 4 + 1$ producto de cada una de las otras categorías

*Nota:* Adaptado de ISO (2021).

### **Microorganismos utilizados en el estudio**

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

Son microorganismos que provienen de una colección reconocida, en este caso, la Colección Americana de Cepas Tipo (ATCC).

**Aerobios mesófilos.** Son un conjunto de microorganismos con crecimiento óptimo a temperaturas entre 30 °C y 40 °C en presencia de oxígeno, su conteo estima el número total de bacterias sin identificarlas (Biosait Europe, 2019). En materia de alimentos, su presencia aporta información sobre las condiciones de salubridad, incluyendo las condiciones higiénicas de la materia prima y cómo se manipuló durante su elaboración (Pascual & Calderón, 2000). Dentro de este grupo se encuentran bacterias como *Escherichia coli*.

***Escherichia coli***. La cepa utilizada deriva de ATCC® 4157™. Su nombre científico completo es *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers. Su nivel de bioseguridad es 1 según la evaluación de riesgos de la edición actualizada de Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos (BMBL, por sus siglas en inglés) y puede utilizarse para ensayos de control de calidad (American Type Culture Collection [ATCC], 2021a).

Las características generales de la especie, incluyen a una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia de las Enterobacteriaceae, que se encuentra presente de forma normal en el intestino de humanos y animales de sangre caliente, sin embargo, algunas cepas pueden provocar infecciones en el tubo digestivo, las vías urinarias u otras partes del organismo (Bush, 2020). Puede transmitirse a través del consumo de agua o alimentos contaminados por lo que se recomienda seguir las prácticas para la inocuidad de los alimentos: limpiar, separar, cocinar y enfriar (OMS, 2018a).

***Salmonella enterica***. La cepa utilizada deriva de ATCC® 51812™. Su nombre científico completo es *Salmonella enterica* subs. *enterica* (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Typhimurium. Su nivel de bioseguridad es 2 según la evaluación de riesgos de la edición actualizada de BMBL y puede utilizarse para ensayos de control de calidad, investigación de enfermedades infecciosas e investigación sobre enfermedades entéricas (ATCC, 2021b).

De manera general *Salmonella* spp. son bacterias Gram negativas en forma de bacilo pertenecientes a la familia de las Enterobacteriaceae, de la que se han identificado más de 2500 serotipos diferentes en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. Se trata de una bacteria omnipresente y resistente, capaz de sobrevivir gran cantidad de tiempo en ambientes secos. Se encuentra de forma frecuente en los alimentos, provocando brotes de salmonelosis, una enfermedad que afecta al aparato intestinal y puede llegar a ser mortal dependiendo del serotipo infectivo (OMS, 2018b).

La bacteria se aloja en los intestinos de animales y humanos y son liberadas en las heces, mismas que pueden contaminar los alimentos si se incorporan en aguas destinadas al riego o para la ingesta de animales, por ello, se recomienda obtener los alimentos en sitios seguros y siempre lavarlos bien antes de consumirlos, además de lavarse bien las manos al estar en contacto con superficies desconocidas, pues pueden estar contaminadas (Mayo Clinic, 2019). Los principales alimentos a los que se le asocia la presencia de *Salmonella* son los huevos y la carne de aves, pero también puede estar presente en carnes de res o cerdo, frutas, verduras, germinados e incluso en alimentos procesados como mantequilla, frutos secos o alimentos congelados (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades [CDC], 2020).

***Staphylococcus epidermidis***. - La cepa utilizada deriva de ATCC® 12228™. Su nombre científico completo es *Staphylococcus epidermidis* (Winslow and Winslow) Evans. Su nivel de bioseguridad es 1 según la evaluación de riesgos de la edición actualizada de BMBL y puede utilizarse para ensayos de control de calidad, bioinformática, pruebas de alimentos y pruebas de medios (ATCC, 2021c).

*S. epidermidis* se presenta como una agrupación de cocos en racimos, son bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas pertenecientes a la familia Staphylococcaceae. Se encuentran de forma normal en la piel y mucosas humanas junto con otras especies de estafilococos coagulasa-negativos. Se le ha asociado con infecciones nosocomiales provocadas por la colonización de cuerpos extraños como catéteres intravenosos, provocando fiebre y eventualmente una bacteriemia y sepsis (Seija, 2006).

### **Normativa**

Los métodos desarrollados por organismos como ISO se utilizan como referencia, pues al ser reconocidos internacionalmente, pueden usarse para comparar los resultados obtenidos

en un laboratorio, garantizando calidad y seguridad de las matrices que se desean controlar (Instituto Tecnológico de la Alimentación [AINIA], 2011).

### ***ISO/IEC 17025***

Norma dirigida a los laboratorios de ensayo y calibración, con el objetivo de describir los requisitos generales que deben cumplir para garantizar su competencia y demostrar su capacidad para generar resultados válidos. Este documento ha sido desarrollado por el comité de ISO para la evaluación de la conformidad (CASCO) y sometido a votación y aprobación de los organismos nacionales de ISO e IEC (Comisión Electrotécnica Internacional) (ISO/IEC, 2017). Con el cumplimiento de los puntos relacionados con los métodos de ensayo de la normativa, el laboratorio en cuestión, puede ser sujeto de acreditación para dichos métodos por parte de un organismo encargado (ISO Tv Intercontinental, 2019), por ejemplo, el SAE.

### ***ISO 16140-3***

La parte 3 de la familia ISO 16140 ha sido desarrollada debido a la necesidad de una metodología para la realización de procesos de verificación en laboratorios que desean implementar métodos de referencia o alternativos previamente validados a sus análisis de rutina. La norma presenta una serie de opciones para la verificación de métodos cualitativos, cuantitativos y de serotipificación, incluyendo las características de desempeño y criterios de aceptación para permitir que el laboratorio usuario elija la que mejor se adapte a sus necesidades y posibilidades.

Este documento ha sido elaborado por el Comité Técnico para Productos Alimenticios ISO/TC 34, Subcomité de Microbiología SC 9, en colaboración con el Comité Técnico del Comité Europeo de Normalización (CEN) para Microbiología de la Cadena Alimentaria CEN/TC 463, de conformidad con el Acuerdo de cooperación técnica entre la ISO y el CEN (Acuerdo de Viena) (ISO, 2021).

**ISO 6579-1**

La parte 1 del método horizontal para la detección, enumeración y serotipificación de *Salmonella*, corresponde únicamente a la detección de *Salmonella* spp., descrita en cuatro pasos: pre enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo, aislamiento e identificación, para finalmente reportar resultados como presencia/ausencia en 25 g. El método puede ser aplicado en productos de consumo humano (incluyendo la leche y productos lácteos), consumo animal, heces animales y muestras ambientales provenientes de la etapa primaria de producción (ISO, 2017).

Este documento ha sido elaborado por el CEN, Comité Técnico para el Análisis de Alimentos – Métodos Horizontales CEN/TN 275, en colaboración con el Comité Técnico para Productos Alimenticios ISO/TC 34, subcomité de Microbiología SC 9, de conformidad con el acuerdo de cooperación técnica entre ISO y CEN (Acuerdo de Viena) (ISO, 2017).

**ISO 4833-1**

La parte 1 de la normativa describe el método horizontal para el recuento de microorganismos a 30 °C aplicando la técnica de conteo en placa por profundidad. Esta norma puede aplicarse a productos de consumo humano o animal, y a muestras ambientales provenientes de áreas de producción y manejo de alimentos y piensos. El responsable del desarrollo de este documento es el Comité Técnico para Productos Alimenticios ISO/TC 34, Subcomité de Microbiología SC 9 (ISO, 2013).

**UNE EN ISO 7218**

Esta norma constituye una guía para el trabajo dentro del laboratorio, incluyendo aporte de conocimiento en cuanto a instalaciones, personal, aparatos y equipamiento, preparación de materiales y medios de cultivo; además, aporta con conocimiento sobre las muestras del laboratorio y su análisis (cualitativo y cuantitativo), incluyendo el recuento. De esta manera,

permite obtener resultados homogéneos entre laboratorios y contribuir con la seguridad del personal y las muestras. La norma ha sido elaborada por el Comité Técnico para Productos Agrícolas Alimenticios ISO/TC 34 en colaboración con el Comité Técnico para el Análisis de los Productos Alimenticios – Métodos Horizontales CEN/TC 275, cuya secretaría se encuentra desempeñada por el Instituto Alemán de Normalización (DIN, por sus siglas en inglés) (Una Norma Española - Norma Europea - Organización Internacional de Normalización [UNE EN ISO], 2007).

### ***UNE EN ISO 11133***

En esta norma se describen procedimientos para ensayos de rendimiento de diferentes medios de cultivo que permiten demostrar que el lote estudiado proporciona resultados consistentes y es adecuado para su uso previsto, mediante criterios de aceptabilidad. Los medios de cultivo preparados bajo esta norma pueden destinarse al análisis microbiológico de productos alimenticios o muestras procedentes del entorno de producción de productos destinados al consumo humano o animal, y para aguas con fines de consumo o utilización para la producción de alimentos, según corresponda. La norma ha sido desarrollada por el Comité Técnico para Productos Alimenticios ISO/TC 34 en colaboración con el Comité Técnico para el Análisis de los productos alimenticios – Métodos Horizontales CEN/TC 275, cuya secretaría la desempeña el DIN (UNE EN ISO, 2014).

### ***ISO 6887-1***

La parte 1 de la familia ISO 6887, menciona las reglas generales para la preparación de suspensiones iniciales y diluciones decimales, que pueden aplicarse a productos destinados al consumo humano o animal. No aplica a productos cuyos procedimientos se encuentren detallados en otras partes de la familia ISO 6887 o a muestras donde las respectivas normas describen instrucciones para su preparación. La normativa fue desarrollada por el Comité

técnico para Productos Alimenticios ISO/TC 34, en colaboración con el comité técnico para el Análisis de Alimentos – Métodos Horizontales CEN/TC 275, cuya secretaría se encuentra a cargo del DIN (ISO, 2017).

### Capítulo III: Metodología

Todos los procedimientos detallados en esta sección fueron realizados dentro de las instalaciones de Agrocalidad, en el laboratorio de Microbiología.

#### **Verificación del funcionamiento de recursos**

##### ***Verificación de equipos***

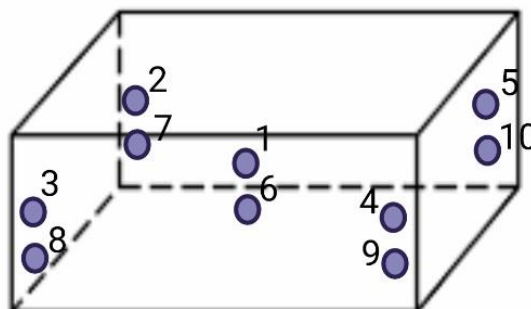
Se verificó el registro de la última calibración o mantenimiento preventivo realizado a los equipos que intervendrían en el ensayo de verificación. Se llevó un registro de la temperatura de los equipos cuyo funcionamiento requiere que se mantengan encendidos todos los días, como: incubadoras, refrigeradores y congelador, en dos momentos dentro de la jornada (mañana y tarde). Con los datos recolectados se realizaron gráficos de control para determinar si el funcionamiento era estable y si las variaciones estaban dentro de lo especificado en las diferentes normas.

El correcto funcionamiento del baño termostático se revisó los días de su uso, una vez que la pantalla digital indicaba la llegada a la temperatura deseada y antes de retirar el medio de cultivo del equipo, para determinar si la distribución de calor era uniforme. La temperatura se tomó con ayuda de un termómetro digital sumergible en cinco puntos a dos profundidades diferentes (Figura 1). Con todos los datos recolectados se analizó la temperatura media, mínima y máxima alcanzada, para determinar si se cumplía con los requerimientos de las normas.



**Figura 1**

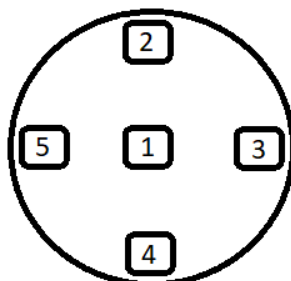
*Puntos de medición de temperatura en el baño termostático*



El funcionamiento de la balanza se determinó mediante un ensayo de repetibilidad tomando cinco medidas de cada pesa de un juego de pesos patrón colocadas en el centro del plato de pesaje, se determinó el promedio de las medidas y se comprobó si el valor obtenido se encontraba dentro del rango que implica un error máximo permisible del 1 % para cada peso patrón. Además, se realizó un ensayo de excentricidad, determinando primero la clase de precisión del instrumento y la escala de verificación según la guía que proporciona la Universidad Industrial de Santander (2008). A continuación, se utilizó una pesa patrón de 50 g y se realizaron lecturas en diferentes puntos del plato de pesaje, según se indica en la Figura 2. Para el criterio de aceptación de esta segunda parte, se consideró que el error calculado en cada pesada no supere el error máximo permisible establecido en la Norma Chilena [NCh] (2001).

**Figura 2**

*Orden de los puntos de medición para el ensayo de excentricidad*



El funcionamiento del autoclave se comprobó utilizando indicadores químicos en cada ciclo de esterilización, reportando el resultado del cambio en una tabla con las fechas de los días en que se utilizó el equipo.

El monitoreo de la mayor parte de equipos se llevó a cabo durante un mes previo al inicio de los ensayos de verificación y durante toda la ejecución de los mismos, exceptuando a: la balanza, cuya verificación se realizó por única vez antes de iniciar los ensayos; y el baño termostático que en conjunto con el autoclave se comprobaron en los días de uso.

### ***Verificación de medios de cultivo***

Todos los medios de cultivo disponibles en el laboratorio provenían de casas comerciales con certificación ISO 11133 y estaban listos para prepararse siguiendo las instrucciones del fabricante, por lo que no se verificó su funcionamiento. Los medios que no se encontraban disponibles en el laboratorio, fueron preparados a partir de sus componentes individuales según las instrucciones de las normas respectivas y sometidos a ensayos de verificación siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 11133.

Antes de ser utilizados, todos los medios fueron inspeccionados visualmente, para comprobar que sus características (color, textura, olor) antes y después de haber sido preparados, autoclavados y dispensados no presentaran ninguna anomalía. Además, se verificó que la fecha de uso recomendada tanto de medios como de componentes individuales fuera respetada.

**Solución salina.** Se realizaron diluciones seriadas en solución salina a partir de un inóculo inicial de *E. coli* con un valor de 0.5 en la escala de McFarland. Se sembró por triplicado los inóculos correspondientes a las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en Agar Triptona Soja (TSA) inmediatamente después de haber terminado de realizar las diluciones, transfiriendo 0.1 ml a cada placa y extendiéndola con ayuda de un asa de Digralsky para obtener conteos en tiempo

cero ( $t_0$ ). Se dejó reposar los inóculos de 45 min a 60 min y a continuación se volvió a sembrar por triplicado las mismas diluciones, de la misma manera mencionada anteriormente para obtener conteos en tiempo uno ( $t_1$ ). Las placas inoculadas se incubaron invertidas a  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante  $72\text{ h} \pm 3\text{ h}$  antes de realizar el conteo de colonias. Se consideró como criterio de aceptación un conteo en  $t_1$  de  $\pm 30\%$  de colonias del recuento original ( $t_0$ ).

**Agua peptona tamponada.** Se realizaron diluciones seriadas en solución salina, a partir de un inóculo inicial de *S. enterica* con un valor de 1 en la escala de McFarland. Se inoculó por triplicado 10 ml de agua peptona tamponada con 1 ml de los inóculos correspondientes a las diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ . Los tubos se incubaron a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante  $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$ . El criterio de aceptación para la productividad del medio fue un cultivo turbio con valores de 1 – 2, según lo describe la Tabla 3.

**Tabla 3**

*Puntuación para la turbidez de medios líquidos*

Valor	Nivel de turbidez
0	Sin turbidez
1	Medio turbio
2	Muy turbio

*Nota:* Adaptado de UNE EN ISO (2014).

**Caldo Muller-Kauffman Tetracionato Novobiocina (Caldo MKTTn).** Se realizaron diluciones seriadas en solución salina a partir de un inóculo inicial de *E. coli* (microorganismo no objetivo) y *S. enterica* (microorganismo objetivo) con un valor de 0.5 y 1, respectivamente en la escala de McFarland. Se transfirió por triplicado 1 ml del inóculo correspondiente a la dilución  $10^{-7}$  de *S. enterica* y  $10^{-3}$  de *E. coli* en 10 ml de caldo MKTTn. Los tubos se incubaron a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$  en aerobiosis. Trascorrido el tiempo de incubación se tomó una asada de los caldos inoculados con *S. enterica* y se estrió en agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), del

mismo modo, se tomó una asada de los caldos inoculados con *E. coli* y se estrió en TSA. El agar XLD se incubó a 37 °C durante 24 h ± 3 h, mientras que TSA se incubó a 30 °C durante 72 h ± 3 h.

Con el microorganismo objetivo se evaluó la productividad, teniendo como criterio de aceptación la obtención de más de 10 colonias en el medio XLD; mientras que con el microorganismo no objetivo se evaluó la selectividad, considerando como criterio de aceptación la obtención de menos de 100 colonias en el medio TSA.

**Agar Semisólido Modificado Rapaport Vasiliadis (Agar MSRv).** Se realizaron diluciones seriadas en solución salina a partir de un inóculo inicial de *E. coli* (microorganismo no objetivo) y *S. enterica* (microorganismo objetivo) con un valor de 0.5 y 1, respectivamente en la escala de McFarland. Se transfirió por triplicado 0.1 ml del inóculo correspondiente a la dilución 10<sup>-7</sup> de *S. enterica* y 10<sup>-3</sup> de *E. coli* (previamente pre enriquecidos en agua peptona tamponada) en placas con aproximadamente 20 ml de agar MSRv, colocando tres gotas igualmente espaciadas sobre el agar. Las placas se incubaron sin invertir a 41.5 °C ± 1 °C durante 24 h ± 3 h.

Con el microorganismo objetivo se evaluó la productividad, teniendo como criterio de aceptación la obtención de una zona turbia gris blanquecina extendida desde las gotas inoculadas. Con el microorganismo no objetivo se evaluó la selectividad, considerando como criterio de aceptación la obtención de un posible crecimiento sin presencia de zonas turbias en los puntos de inoculación.

**Agar urea.** Se estrió por duplicado la superficie inclinada del agar con *S. epidermidis* (microorganismo no objetivo) y *S. enterica* (microorganismo objetivo), se incubó a 37 °C ± 1 °C durante 24 h ± 3 h en aerobiosis. El criterio de aceptación fue que el medio se mantuviera de color amarillo en el tubo inoculado con el microorganismo objetivo.

Todos los medios fueron sometidos a una prueba de esterilidad, incubándolos sin inocular según las especificaciones y revisando que no presentaran crecimiento.

### **Control de ambientes**

Se registró la temperatura del laboratorio en dos momentos del día, por la mañana y por la tarde durante todo el tiempo que duró el estudio. Con los datos recolectados se realizó un gráfico de control.

Además, se utilizaron placas con medio PCA y PDA para el crecimiento de bacterias y hongos, respectivamente. Las placas fueron colocadas abiertas durante 30 minutos en el sitio dentro del laboratorio donde se tiene más afluencia de gente y en el interior de las cabinas de bioseguridad que se utilizaban para realizar los diferentes ensayos. Transcurrido el tiempo, las placas fueron incubadas a  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 24 h a 48 h en el caso de PCA, mientras que se incubó a temperatura ambiente durante 48 h al medio PDA. Este control se llevó a cabo semanalmente, priorizando el control del ambiente en el interior de las cabinas.

### **Obtención de muestras**

Las matrices con las que se trabajó correspondían a diferentes categorías de alimentos como se observa en la Tabla 4, según lo especificado en la norma ISO 16140-3. Las muestras fueron obtenidas en diferentes puntos comerciales, recolectadas en bolsas plásticas con cremallera y transportadas al laboratorio manteniendo la cadena de frío. En ocasiones se utilizaron también muestras que llegaban al laboratorio usuario. Se comprobó la temperatura de todos los alimentos a su llegada al laboratorio, aceptando aquellos que se encontraran en un rango de  $0\text{ °C}$  a  $5\text{ °C}$ , y se colocaban en refrigeración a  $5\text{ °C}$  hasta el momento de su análisis.

**Tabla 4**

*Alimentos usados en el ensayo de verificación de los métodos microbiológicos seleccionados*

<b>Tipo de verificación</b>	<b>Categoría de alimento</b>	<b>Tipo de alimento</b>	<b>Alimento</b>
<b>Verificación de la implementación</b>	Aves de corral crudas y productos de aves de corral listos para cocinar	Carnes frescas (sin procesar)	Cortes de carne (carne de pollo)
<b>Verificación de productos</b>	Productos frescos y frutas	Hortalizas y frutas (sin procesar) no descritas anteriormente	Cultivos (ajo y frutillas)
	Alimentos para mascotas y piensos	Alimentos secos ( $a_w \leq 0.7$ )	Piensos

*Nota:* Adaptado de ISO (2021).

#### **Ensayo de desinfección/esterilización de muestras**

Cada alimento tuvo un tratamiento diferente. Los ajos y frutillas se sometieron a un proceso mecánico de limpieza con esponja o cepillo bajo abundante agua de grifo para eliminar tierra y otros materiales, a continuación, se los sumergió en detergente al 5 % durante 5 min con agitación, se eliminó el exceso con agua destilada estéril y se sumergieron en una solución desinfectante: hipoclorito de sodio al 0.6 % durante 5 min con agitación, los alimentos se aclararon con agua destilada estéril suficiente. A continuación, se los sometió a un ciclo de esterilización en autoclave, 5 min para la frutilla y 10 min para el ajo, a 121 °C y 1.1 bar. Para la carne de pollo se aplicó un ciclo de esterilización utilizando el autoclave con una programación de 121 °C durante 5 min y 1.1 bar. Los piensos fueron esterilizados en autoclave aplicando un ciclo de 15 min a 121 °C y 1,1 bar.

De los alimentos desinfectados/esterilizados se tomaron porciones de 10 g y se inocularon en 90 ml de agua peptona. Se homogeneizó la mezcla durante 1-2 min y se dejó reposar 15 min. Se comprobó la eliminación de microorganismos aplicando la técnica de conteo

en placa por profundidad (explicada a detalle más adelante). El procedimiento se hizo por duplicado, contando y comparando el crecimiento en placa de las muestras desinfectadas/esterilizadas con las no desinfectadas/esterilizadas.

### **Preparación de inóculos**

Cada ensayo tuvo una forma diferente de preparación de inóculos, pero todos partieron de un cultivo fresco conseguido a partir del lote de reserva de referencia obtenido desde las cepas de referencia de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) disponibles en el laboratorio. Las cepas se encontraban en congelación a  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , fueron descongeladas rápidamente, se tomó una asada de *S. enterica*, *E. coli* o *S. epidermidis*, según correspondía y se inocularon en 5 ml de Caldo Tripteína Soya (TSB), se incubó a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 18 h a 24 h en aerobiosis. Transcurrido el tiempo, se realizó una tinción Gram para verificar la pureza de los cultivos.

Todos los inóculos se obtuvieron siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 11133 e ISO 16140-3, y se detallan en ítems separados a continuación, exceptuando aquellos que fueron utilizados para las pruebas de rendimiento de medios, cuya preparación se describe en la metodología correspondiente a dicha sección.

### ***Inóculos para el ensayo de verificación del método cuantitativo***

Para la verificación de implementación se trabajó con la contaminación natural del alimento correspondiente para el ensayo, por lo que no fue necesaria la preparación de inóculos.

Para el ensayo de verificación de productos, a partir del cultivo fresco de *E. coli* se obtuvo un inóculo inicial con un valor de 0.5 en la escala de McFarland y se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$ .

### ***Inóculos para el ensayo de verificación del método cualitativo***

Tanto para el ensayo de verificación de la implementación como para el de productos se prepararon inóculos de manera similar. A partir del cultivo fresco de *S. enterica*, se obtuvo un inóculo inicial con un valor de 1 en la escala de McFarland y se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-7}$ , a continuación, se realizaron diluciones 1:3 para alcanzar tres niveles de contaminación adecuados como se observa en la Tabla 5.

**Tabla 5**

*Alternativa para lograr los niveles de inoculación en las porciones de ensayo*

<b>Nivel alto</b> <b>9 × LOD<sub>50</sub>/porción de ensayo</b>	<b>Nivel intermedio</b> <b>3 × LOD<sub>50</sub>/porción de ensayo</b>	<b>Nivel bajo</b> <b>1 × LOD<sub>50</sub>/porción de ensayo</b>
Esto debería ser como máximo nueve veces el LOD <sub>50</sub> esperado.	A partir del nivel de inoculación alto, realice una dilución 1:3 para alcanzar el nivel intermedio.	A partir del nivel de inoculación intermedio, realizar una dilución 1:3 para alcanzar el nivel bajo.

*Nota:* Adaptado de ISO (2021).

### **Protocolo de verificación del método cuantitativo para el conteo de aerobios mesófilos, según**

#### **ISO 4833**

#### ***Verificación de implementación***

Se trabajó con 12 muestras de laboratorio del mismo alimento: pollo. De cada muestra se tomaron dos porciones de ensayo: A y B. A continuación, se aplicó el método a verificar, variando las condiciones lo más posible para cada porción: operador, equipos y lote de medio de cultivo, para lograr gran variabilidad en los resultados.

Cada porción tenía un peso de 10 g y se inocularon individualmente en 90 ml de agua peptona (dilución inicial: 1/10), mezclando a fondo. A continuación, se realizaron tres diluciones



seriadas más (factor de dilución: 10) en agua peptona en tubos para obtener valores contables según la norma ISO 7218. Se transfirió 1 ml de cada dilución a placas Petri estériles y se vertió aproximadamente 20 ml de medio PCA a una temperatura entre 44 °C y 47 °C, se mezcló cuidadosamente el inóculo y el medio mediante movimientos de rotación de la placa Petri y se dejó solidificar sobre una superficie horizontal fresca. Las placas se incubaron invertidas a 30 °C ± 1 °C durante 72 h ± 3 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el conteo y se retuvieron las placas de dos diluciones consecutivas que presentaban entre 10 y 300 colonias, con lo cual se calculó el número de microorganismos como su media corregida, según la Fórmula 1.

$$N = \frac{\Sigma c}{V \times 1.1 \times d} \quad \text{Fórmula 1}$$

Donde:

N Número de microorganismos presentes en la muestra para análisis

$\Sigma C$  Suma de las colonias contadas en las dos placas escogidas de las dos diluciones consecutivas, de las cuales al menos una contiene un mínimo de 10 colonias.

V Volumen de inóculo utilizado en cada placa, en mililitros

d Dilución correspondiente a la primera dilución escogida

A continuación, los datos fueron transformados para determinar la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio ( $S_{IR}$ ) según la Fórmula 2.

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

Donde:

$S_{IR}$  desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio;

i índice de la muestra de laboratorio,  $i=1$  a  $n$  ( $n \geq 10$ );

n número de muestras;

$Y_{iA}$ ,  $Y_{iB}$  datos transformados logarítmicamente en  $\log_{10}$  (ufc/g) o  $\log_{10}$  (ufc/ml)

La aceptabilidad del resultado, se consideró de acuerdo a lo especificado en la norma ISO 16140-3.

### ***Verificación de productos***

Los alimentos seleccionados para el ensayo se contaminaron artificialmente en seis niveles para alcanzar el rango de contaminación del laboratorio usuario en dichos alimentos. Cada nivel se inoculó por duplicado transfiriendo 1 ml de inóculo a la suspensión inicial de cada alimento, que contenía 10 g de muestra y 90 ml de agua peptona (dilución 1/10) y se mezcló a fondo. A continuación, se realizaron tres diluciones seriadas más (factor de dilución: 10) en agua peptona en tubos para obtener valores contables según la norma ISO 7218. Se tomó 1 mL de cada dilución de cada alimento y se colocó en diferentes cajas Petri bien identificadas, usando una punta distinta en cada caso. Se vertió aproximadamente 20 ml de medio PCA a una temperatura entre 44 °C y 47 °C, se mezcló el inóculo y el medio cuidadosamente mediante movimientos de rotación de la placa Petri y se dejó reposar hasta que solidifique sobre una superficie horizontal fresca. Las placas se incubaron invertidas a 30 °C  $\pm$  1 °C durante 72 h  $\pm$  3 h. El mismo procedimiento fue aplicado a suspensiones iniciales de inóculos preparadas transfiriendo 1 ml a tubos con 9 ml de agua peptona. Adicionalmente, se incluyó una muestra control para comprobar la cantidad de microorganismos presentes en los alimentos sin inocular.

Transcurrido el tiempo de incubación, se registró el conteo de las placas de dos diluciones consecutivas que presentaban entre 10 y 300 colonias, con lo cual se calculó el número de microorganismos como su media corregida utilizando la Fórmula 1, tanto para los alimentos contaminados como para las suspensiones de inóculos y se estableció la correspondiente comparación.

Al final del ensayo, solo se consideraron los resultados de tres niveles de inoculación para tener valores en un nivel bajo, medio y alto. La aceptabilidad de los resultados, se consideró de acuerdo a lo especificado en la norma ISO 16140-3.

**Protocolo de verificación del método cualitativo para la detección de *Salmonella* spp.**

Se utilizó el protocolo 1 recomendado por la norma ISO 16140-3, en cuyo diseño experimental se consideran 10 repeticiones según lo descrito en la Tabla 6.

**Tabla 6**

*Número de repeticiones por nivel de inoculación para el método cualitativo*

<b>Nivel de inoculación de la porción de ensayo</b>				
<b>Nivel alto</b>	<b>Nivel intermedio</b>	<b>Nivel bajo</b>	<b>Blanco</b>	<b>Número total</b>
<b>9×LOD<sub>50</sub>/porción</b>	<b>3×LOD<sub>50</sub>/porción</b>	<b>1×LOD<sub>50</sub>/porción</b>		<b>de</b>
<b>de ensayo</b>	<b>de ensayo</b>	<b>de ensayo</b>		<b>repeticiones</b>
1	4	4	1	10

*Nota:* Adaptado de ISO (2021).

Se prepararon 10 porciones de ensayo de 25 g del mismo alimento no contaminado con el microorganismo objetivo y se inocularon de forma individual en 225 ml de agua peptona tamponada (suspensión inicial). Se inocularon las suspensiones iniciales con los inóculos preparados (2.5 ml para la verificación de la implementación y 1 ml para la verificación de productos) y se homogeneizó a fondo para lograr que los microorganismos abarquen toda la superficie de la muestra.

El nivel de inoculación más alto se verificó en paralelo mediante siembra a profundidad en medio PCA y se enumeró según lo descrito en la norma ISO 7218. A continuación, se aplicó el método a verificar. El proceso se llevó a cabo en cuatro fases que tuvieron lugar en días diferentes para respetar los tiempos de incubación.

La fase de pre enriquecimiento, se describió con anterioridad, donde las porciones de ensayo fueron inoculadas en 225 mL de agua peptona tamponada. Una vez inoculadas, se dejó reposar 30 min y se incubó entre 34 °C y 38 °C durante 18 h  $\pm$  2 h.

En la fase de enriquecimiento selectivo se inoculó agar MSRV a partir de cada cultivo pre enriquecido, depositando de 1 a 3 gotas igualmente espaciadas en la superficie del medio, se incubó a 41.5 °C durante 24 h  $\pm$  3 h sin invertir las placas. También se transfirió 1 mL de cada cultivo pre enriquecido a diferentes tubos con 10 mL de caldo MKTTn y se incubó a 37 °C durante 24 h  $\pm$  3 h.

A continuación, se determinó la zona de crecimiento positivo en cada placa con agar MSRV y se tomó una asada del punto de crecimiento opaco más alejado de los puntos de inoculación, justo dentro del borde del crecimiento opaco, asegurándose de no haber extraído grandes grumos de agar y se estrió por agotamiento en la superficie del agar XLD y del agar *Salmonella Shigella* (SS). También se tomó una asada de cada cultivo en caldo MKTTn y se estrió por agotamiento en agar XLD y en agar SS. Las placas con agar XLD se incubaron invertidas a 37 °C durante 24 h  $\pm$  3 h, mientras que las placas con agar SS se incubaron invertidas a 35 °C - 37 °C durante 18 h a 24 h.

De las cuatro combinaciones obtenidas para cada muestra, se seleccionó la placa que presentara un cultivo puro con colonias bien aisladas y se escogió al menos una para realizar las pruebas de confirmación bioquímica.

Durante las pruebas de confirmación bioquímica se utilizaron tres medios de cultivo: agar Triple Azúcar Hierro (TSI, por sus siglas en inglés), agar urea y un medio para la descarboxilación de la L-lisina, en este caso, Agar Lisina Hierro (LIA, por sus siglas en inglés). El agar TSI se sembró por picadura en la parte profunda y por estrías en la parte inclinada, a continuación, se incubó a 37 °C  $\pm$  1 °C durante 24 h  $\pm$  3 h. El agar urea se sembró estriando la

superficie inclinada y se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ , examinando de vez en cuando. El medio LIA se sembró picando la parte profunda del agar y estriando la parte inclinada, y se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ .

Las reacciones positivas o negativas se interpretaron de acuerdo a lo especificado en la norma ISO 6579-1, y los resultados se compararon con la guía proporcionada por la norma ISO 16140-3 para la determinación del límite de detección estimado y su límite de aceptabilidad.

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos fueron ingresados en diferentes hojas de Excel, programadas para analizarlos y arrojar los resultados correspondientes de forma directa, incluyendo la afirmación o rechazo de los criterios de aceptabilidad, cuando correspondía.

## Capítulo IV: Resultados

### Verificación de recursos

#### *Verificación de equipos*

En cada gráfico de control se muestra una leyenda, donde Prom X (curva azul) representa la variación de la temperatura a través del tiempo, LCX (línea amarilla) es el límite central, LCS y LCI (líneas de color verde) son límites de control superior e inferior, mientras que LES y LEI (líneas de color rojo) son los límites de especificación superior e inferior.

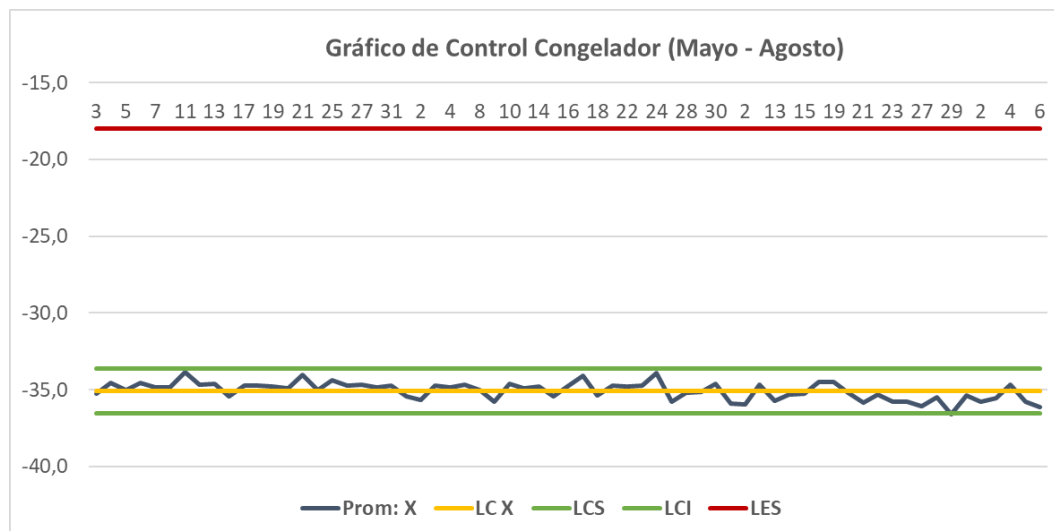
Los límites de control permiten visualizar que el equipo se encuentra funcionando bajo control, mientras que los límites de especificación indican que el equipo funciona dentro de los límites previstos.

Dentro de los equipos destinados a enfriar, se controló la temperatura de un congelador y dos refrigeradores. Los gráficos de control para estos tres equipos se visualizan en la Figura 3, Figura 4 y Figura 5, respectivamente.

El congelador funciona a temperaturas inferiores a los  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  y es utilizado para la conservación de cepas. La Figura 3 indica que el equipo ha funcionado de forma controlada durante el tiempo de observación y que además ningún punto pasa del límite de especificación establecido en la normativa.

**Figura 3**

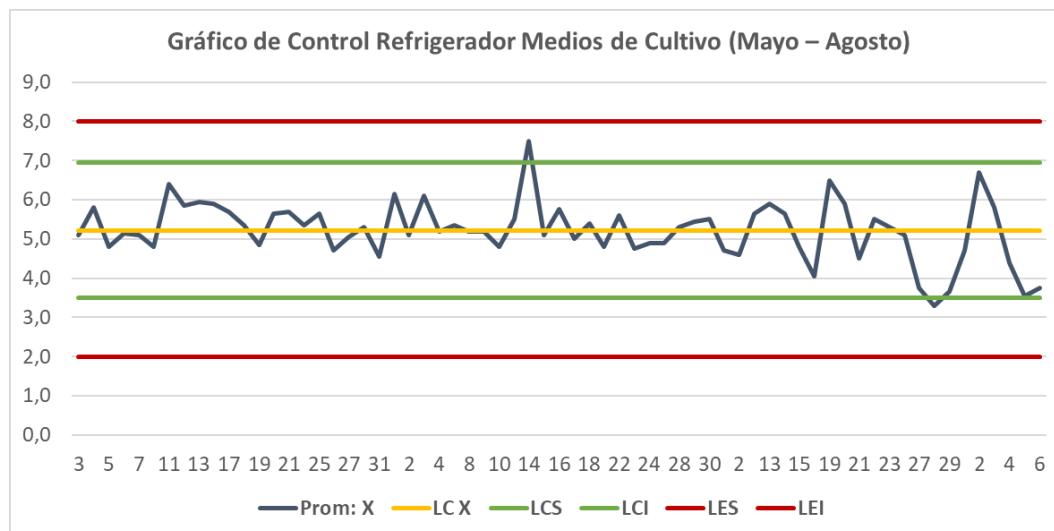
*Gráfico de control del congelador*



En la Figura 4 se observa que dos puntos pasan de los límites de control, uno por encima del superior y uno por debajo del inferior, sin embargo, gran parte del funcionamiento se encuentra bajo control y no sobrepasa los límites de especificación.

**Figura 4**

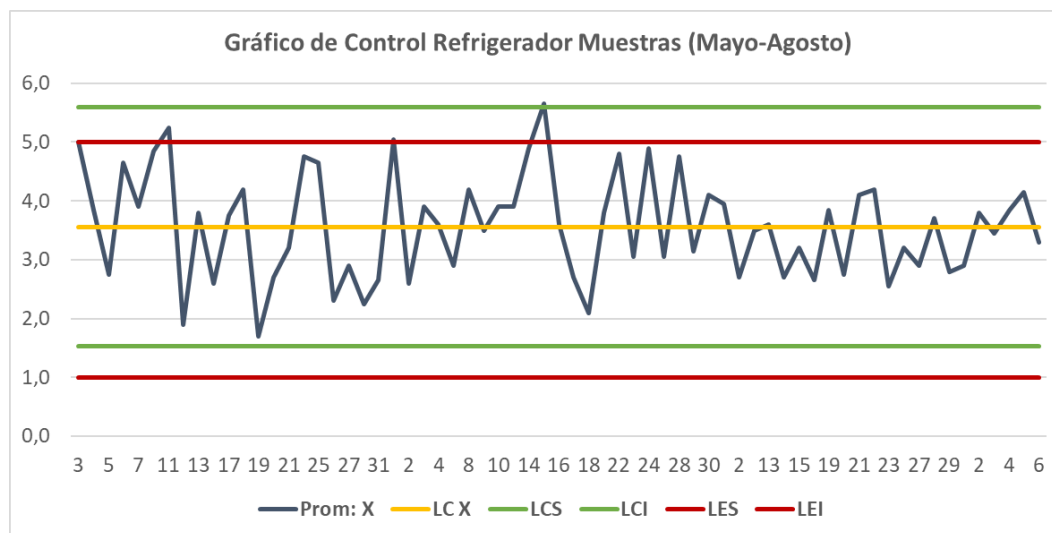
*Gráfico de control del refrigerador para medios de cultivo*



La Figura 5 muestra un funcionamiento controlado exceptuando por un punto que sobrepasa el límite superior de control, sin embargo, se observa también que dos puntos sobrepasan el límite superior de especificación.

**Figura 5**

*Gráfico de control para el refrigerador de muestras*



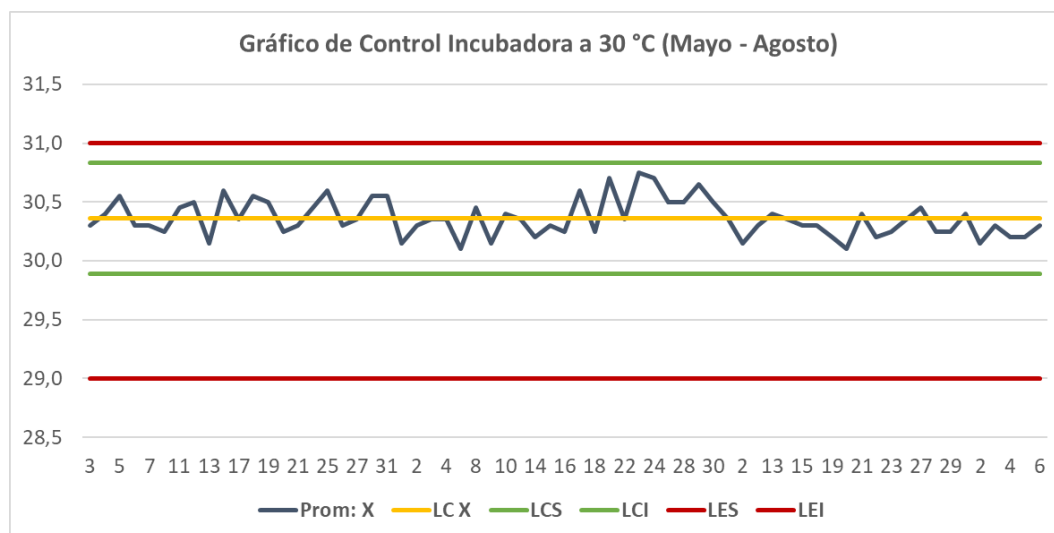
Para los equipos de incubación se destinaron valores específicos de temperatura, de esta manera, se tuvo un equipo diferente para incubación a 30 °C, 37 °C y 41.5 °C. Los gráficos de control para estos equipos se visualizan en la Figura 6, Figura 7 y Figura 8, respectivamente.

La Figura 6 indica cómo la incubadora programada para funcionar a 30 °C presentó un comportamiento controlado y dentro de los límites de especificación, durante todo el tiempo de observación.



**Figura 6**

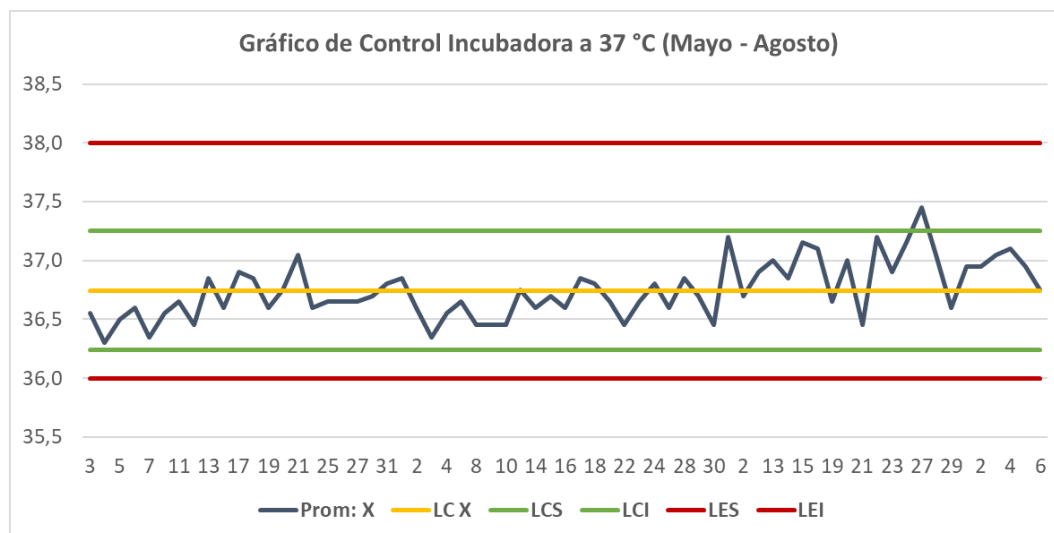
*Gráfico de control de incubadora programada para funcionar a 30 °C*



En la Figura 7 se observa que un punto sobresale del límite superior de control, pero de manera general el equipo presenta un funcionamiento controlado y dentro de los límites de especificación.

**Figura 7**

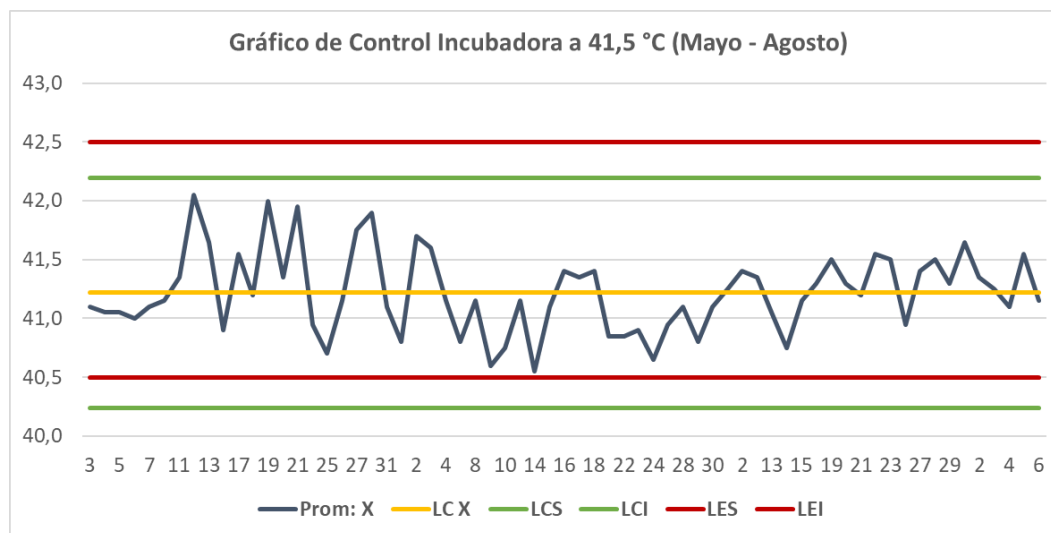
*Gráfico de control de incubadora programada para funcionar a 37 °C*



La Figura 8 muestra que la incubadora regulada para funcionar a 41.5 °C presenta un funcionamiento controlado y dentro de los límites de especificación a lo largo de todo el tiempo de observación.

**Figura 8**

*Gráfico de control de incubadora programada para funcionar a 41.5 °C*



Respecto al baño termostático, la Tabla 7 muestra un resumen de todos los datos recolectados de las mediciones de temperaturas en los diferentes puntos seleccionados y se ve que caen dentro de los requerimientos.

**Tabla 7**

*Resumen de la distribución de calor en el baño termostático*

Temperatura Requerida	Condición de ensayo	Resultado Temperatura			Acepto/Rechazo
		Min	Prom	Max	
44 °C - 47 °C	Vacío	44,1	44,9	45,4	Aceptado
	Con medio	44,2	45,0	46,1	Aceptado
47 °C - 50 °C	Vacío	47,8	48,0	48,2	Aceptado
	Con medio	47,5	48,1	48,7	Aceptado

*Nota:* El manejo de los datos se basó en el estudio realizado por Olavarria (2019).

Los datos obtenidos del ensayo de repetibilidad de la balanza se reportan en la Tabla 8, donde se puede observar que 10 de los 12 promedios obtenidos se encuentran dentro de los límites conseguidos al considerar el 1 % de error del valor nominal de las pesas patrón.

**Tabla 8**

*Resultados del ensayo de repetibilidad de la balanza*

<b>Peso patrón</b>	<b>U</b>	<b>Promedio de pesaje</b>	<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
<b>100</b>	g	99,99956	99,000000	101,0000	Aceptado
<b>50</b>	g	50,00020	49,500000	50,5000	Aceptado
<b>20</b>	g	20,00034	19,800000	20,2000	Aceptado
<b>10</b>	g	9,99982	9,900000	10,1000	Aceptado
<b>5</b>	g	5,00042	4,950000	5,0500	Aceptado
<b>1</b>	g	0,99994	0,990000	1,0100	Aceptado
<b>0,5</b>	g	0,50084	0,495000	0,5050	Aceptado
<b>0,1</b>	g	0,10004	0,099000	0,1010	Aceptado
<b>0,05</b>	g	0,05024	0,049500	0,0505	Aceptado
<b>0,01</b>	g	0,01012	0,009900	0,0101	Rechazado
<b>0,005</b>	g	0,00500	0,004950	0,0051	Aceptado
<b>0,002</b>	g	0,00196	0,001980	0,0020	Rechazado

*Nota:* U = Unidad

Para el ensayo de excentricidad, los datos se exponen en la Tabla 9, donde se puede observar que los errores obtenidos son menores al error máximo permitido, para un peso de rango medio.

**Tabla 9***Resultados del ensayo de excentricidad de la balanza*

<b>Posición</b>	<b>Pesada</b>	<b>Error</b>	<b>EMP</b>	<b>Acepto/Rechazo</b>
<b>1</b>	50,0007	0,0007	0,0020	Acepto
<b>2</b>	50,0001	0,0001	0,0020	Acepto
<b>3</b>	50,0000	0,0000	0,0020	Acepto
<b>4</b>	50,0004	0,0004	0,0020	Acepto
<b>5</b>	49,9997	0,0003	0,0020	Acepto
<b>1</b>	50,0001	0,0001	0,0020	Acepto
<b>Error Máximo de Pesada</b>		<b>0,0007</b>		

*Nota:* EMP = Error Máximo Permitido.

El funcionamiento del autoclave se determinó por el cambio de coloración de la cinta adhesiva para autoclave en todos los usos. La Tabla 10, muestra los resultados.

**Tabla 10***Resultados del indicador químico para el autoclave*

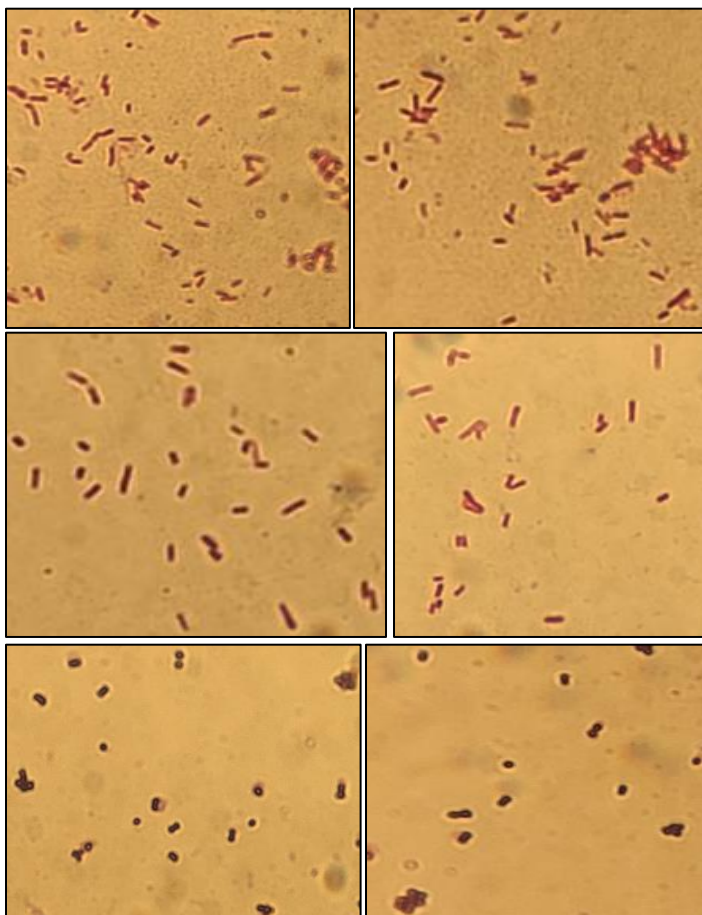
<b>Fecha</b>	<b>No. Usos</b>	<b>No. Cambios</b>	<b>Fecha</b>	<b>No. Usos</b>	<b>No. Cambios</b>
31/05/2021	1	1	13/07/2021	4	4
01/06/2021	2	2	19/07/2021	2	2
15/06/2021	1	1	20/07/2021	2	2
16/06/2021	1	1	21/07/2021	1	1
18/06/2021	1	1	22/07/2021	1	1
22/06/2021	2	2	27/07/2021	2	2
23/06/2021	1	1	29/07/2021	4	4
24/06/2021	1	1	02/08/2021	1	1
28/06/2021	1	1	04/08/2021	2	2
29/06/2021	1	1	06/08/2021	2	2
12/07/2021	1	1	09/08/2021	4	4

### **Verificación de medios de cultivo**

Empezando por la comprobación de la pureza de los cultivos frescos, la Figura 9 muestra los resultados de las tinciones Gram realizadas los días en que se prepararon los inóculos, o en el caso del agar urea, cuando se requirió del microorganismo.

**Figura 9**

*Tinción Gram de los cultivos frescos preparados*



*Nota:* Las imágenes están ordenadas de arriba hacia abajo en pares correspondientes a *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*, respectivamente.

**Solución salina.** Los conteos realizados tras los tiempos de incubación, están registrados en la Tabla 11. Se observa que el porcentaje de recuperación a  $t_1$  se encuentra dentro de los límites establecidos por la norma ISO 11133.

**Tabla 11**

*Resultados del conteo de microorganismos en solución salina*

<b>Micro organismo</b>	<b>Valor Inóculo</b>	<b>Prom t<sub>0</sub></b>	<b>Prom t<sub>1</sub></b>	<b>30% conteo inicial</b>	<b>L. I. Aceptación</b>	<b>L. S. Aceptación</b>	<b>Aceptado/Rechazado</b>
<b><i>E. coli</i></b>	10 <sup>-6</sup>	10	13	3	7	13	Aceptado
	10 <sup>-5</sup>	78	85	23,5	55	102	Aceptado
	10 <sup>-4</sup>	407	381	122,1	285	529	Aceptado
<b><i>S. enterica</i></b>	10 <sup>-6</sup>	18	18	5,4	13	23	Aceptado
	10 <sup>-5</sup>	135	161	40,4	94	175	Aceptado
	10 <sup>-4</sup>	835	1023	250,4	584	1085	Aceptado

*Nota:* Prom t<sub>0</sub> = Promedio en tiempo cero, Prom t<sub>1</sub> = Promedio en tiempo uno, L. I. = Límite

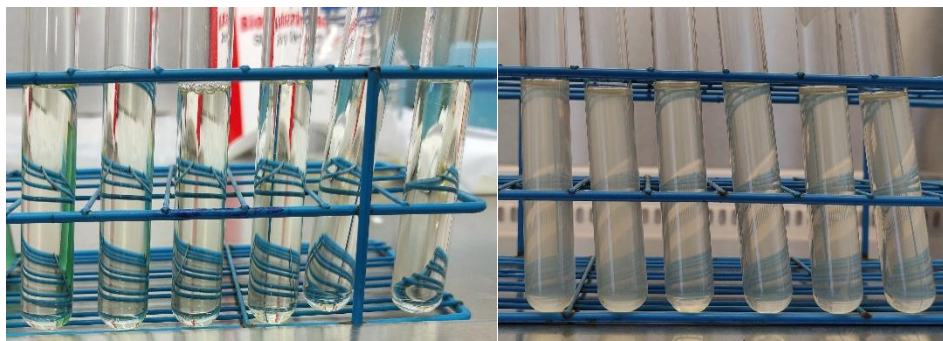
inferior, L. S. = Límite superior. Los límites se calcularon considerando valores  $\pm 30\%$  del conteo inicial promedio (Prom t<sub>0</sub>).

**Agua peptona tamponada.** Después del tiempo de incubación se verificó la presencia de turbidez en los tubos inoculados y se puntuó con valores de 0 a 2 según lo descrito en la Tabla 3.

Como se observa en la Figura 10, se determinó la obtención de una turbidez media, correspondiente a un valor de 1 en todos los tubos inoculados.

**Figura 10**

*Evaluación de la turbidez en agua peptona tamponada*



*Nota:* La imagen a la izquierda muestra los tubos de agua peptona tamponada inoculada sin incubar. La imagen a la derecha muestra los tubos de agua peptona tamponada inoculada e incubada. Los tubos de ambas imágenes se encuentran ordenados por triplicado desde la dilución más alta a la más baja inoculada:  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ , respectivamente.

**Caldo Muller-Kauffman Tetracionato Novobiocina (Caldo MKTTn).** El caldo no presentó cambios que permitieran comprobar la presencia de crecimiento microbiano tras ser incubado, sin embargo, al realizar el aislamiento selectivo para *Salmonella* spp. se determinó un resultado positivo de crecimiento, puesto que se obtuvieron más de 10 colonias en cada placa inoculada, como se observa en la Figura 11.

**Figura 11**

*Confirmación de presencia de microorganismos objetivos en caldo MKTTn*



Las placas de TSA inoculadas con *E. coli* no presentaron crecimiento de colonias, este resultado se observa en la Figura 12.

### Figura 12

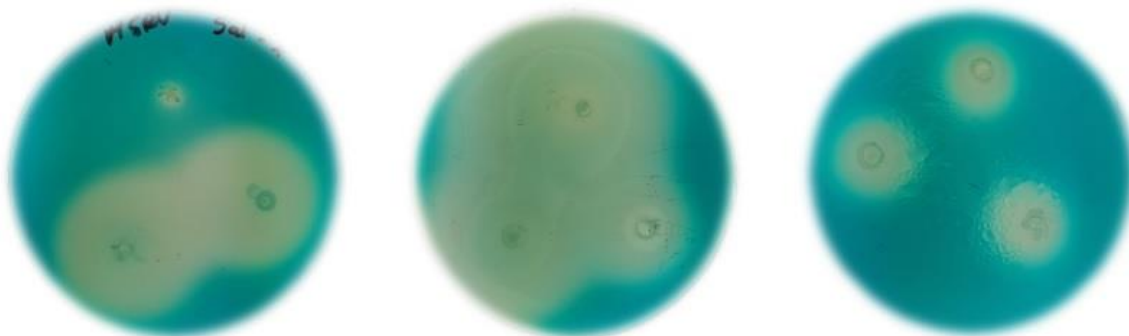
*Confirmación de inhibición de microorganismos no objetivos en caldo MKTTn*



**Agar Semisólido Modificado Rapaport-Vasiliadis (Agar MSRV).** El agar inoculado con *S. enterica* sí presentó zonas turbias grises blanquecinas (Figura 13), mientras que el agar inoculado con *E. coli* no mostró ningún cambio (Figura 14).

### Figura 13

*Confirmación de presencia de microorganismo objetivo en agar MSRV*





**Figura 14**

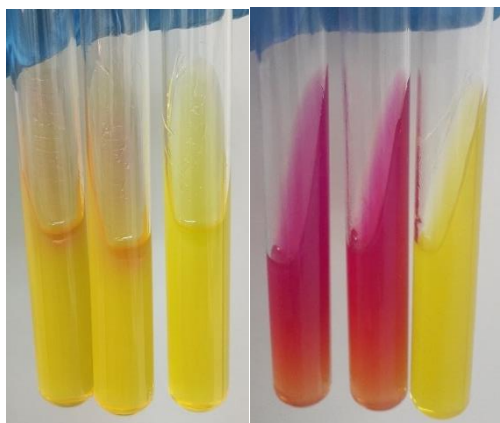
*Confirmación de inhibición de microorganismo no objetivo en agar MSRV*



**Agar urea.** El funcionamiento del medio se comprobó por el mantenimiento del color amarillo en el medio inoculado con el microorganismo objetivo, mientras que el microorganismo no objetivo provocó un cambio de color a una tonalidad rosa-rojiza de la parte inclinada del medio tras 24 h de incubación y de todo el medio después de 96 h de incubación (Figura 15).

**Figura 15**

*Confirmación de funcionamiento del medio agar urea*



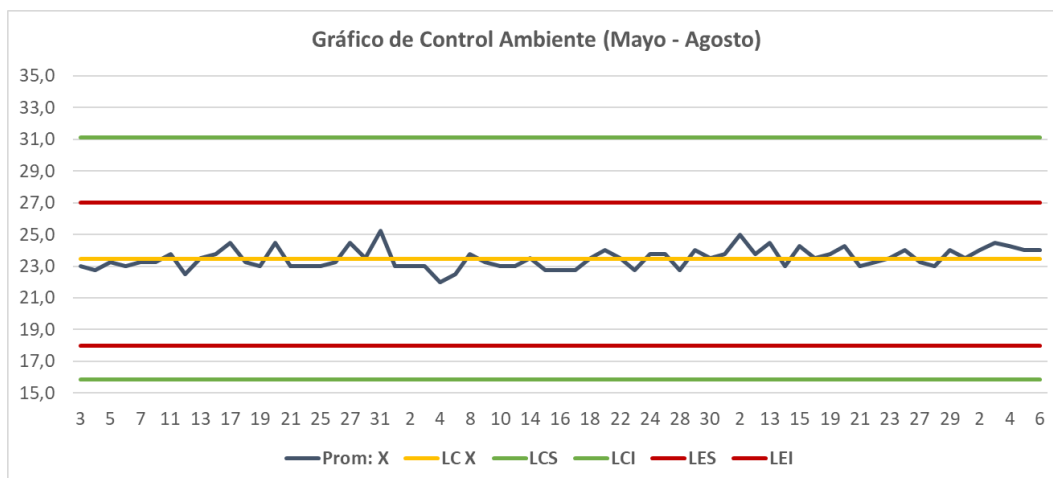
*Nota:* La imagen a la izquierda muestra los cambios del agar tras 24 horas de incubación, mientras que la de la derecha muestra los cambios tras 96 h en incubación. Los dos primeros tubos están inoculados con *S. epidermidis*, mientras que el tercer tubo se encuentra inoculado con *S. enterica*.

### Control de ambientes

El gráfico de control de la Figura 16 muestra que la temperatura en el laboratorio se encuentra controlada y cumple con las especificaciones previstas.

**Figura 16**

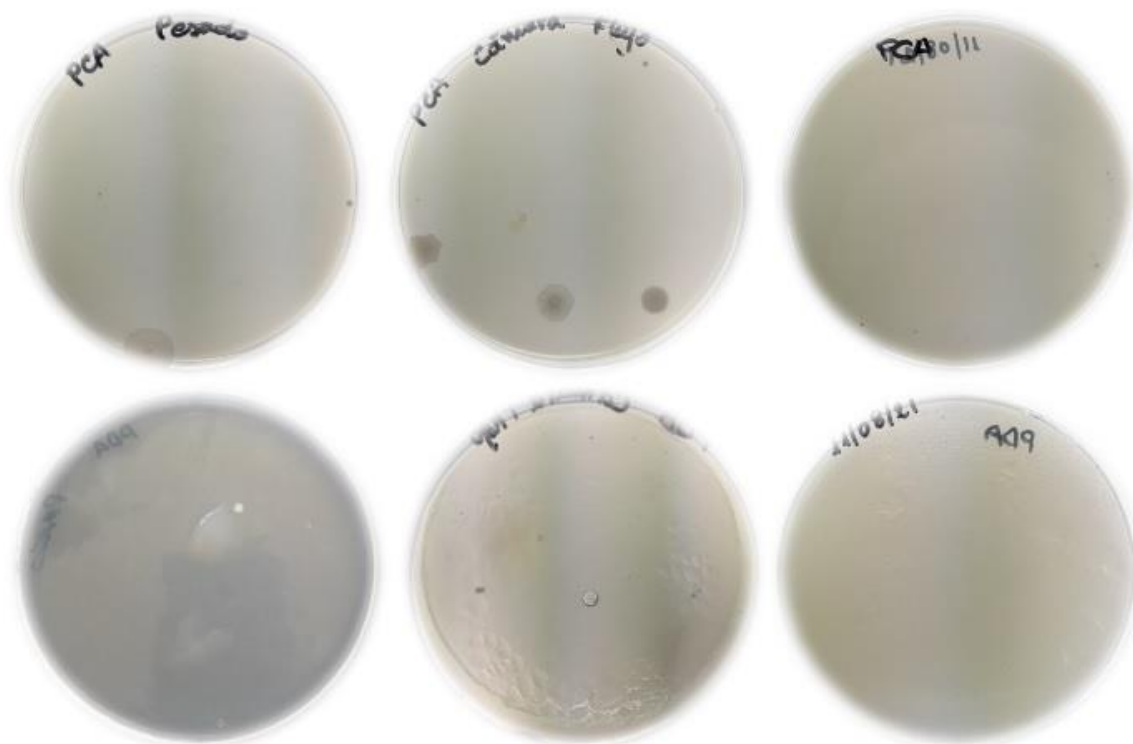
*Gráfico de control de ambiente*



Adicionalmente, el control microbiológico realizado en la locación con mayor afluencia dentro del laboratorio, correspondiente al área de pesaje, preparación de medios y lavado, mostró que la contaminación es baja, obteniendo un crecimiento bacteriano promedio de 3 UFC/placa y crecimiento fúngico promedio de 2 UFC/placa. La Figura 17 muestra los resultados de una de las semanas en las que se aplicó el procedimiento de control microbiológico.

**Figura 17**

*Control microbiológico en área de pesaje, preparación de medios y lavado, y cabinas de bioseguridad*



*Nota:* Las imágenes en la parte superior muestran los resultados obtenidos en el control microbiológico bacteriano en medio PCA, mientras que en la parte inferior se encuentran los resultados obtenidos en el control microbiológico fúngico en medio PDA. Las imágenes se encuentran ordenadas de izquierda a derecha y corresponden a: Zona de gran afluencia en el laboratorio, cabina de bioseguridad 1 y cabina de bioseguridad 2.

#### **Ensayo de desinfección/esterilización de alimentos**

En la Figura 18 se pueden observar los alimentos esterilizados según el procedimiento descrito en el apartado de metodología. Se aprecia que las características iniciales no han variado significativamente a simple vista. Para constancia del ciclo de esterilización aplicado, se ha fotografiado la cinta de autoclave con el respectivo cambio de coloración.

**Figura 18***Alimentos esterilizados*

A continuación, en la Tabla 12 se reporta el resultado del conteo microbiano antes y después de aplicar el proceso de esterilización. La reducción microbiana es alta en los tres alimentos.

**Tabla 12**

*Resultado comparativo del contenido microbiano en los alimentos antes y después de ser esterilizados*

Alimento	Repeticiones antes			Prom	Repeticiones después			Prom
	1	2	3		1	2	3	
<b>Pollo</b>	560	580	756	632	5	10	7	7
<b>Frutilla</b>	876	756	798	810	1	1	0	1
<b>Ajo</b>	1148	968	1102	1073	0	1	0	0
<b>Pienso</b>	75	49	63	62	3	0	1	1

*Nota:* Prom = Promedio. Los promedios se redondearon a la cifra superior o inferior inmediata según correspondía para obtener valores enteros.

### **Verificación del método horizontal para recuento de aerobios mesófilos totales a 30 °C**

#### ***Verificación de implementación***

Se tomaron en cuenta los resultados de las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , por presentar valores contables entre 10 y 300 colonias. A partir de estos datos, se aplicó la Fórmula 1 para conseguir un valor corregido del conteo para las dos diluciones críticas consideradas, y a continuación, se evaluaron esos resultados para obtener los valores de la Tabla 13.

**Tabla 13***Resultados del proceso de verificación de implementación del método cuantitativo*

No.	Resultado Operador A ( $x_{iA}$ ) UFC/g	Resultado Operador B ( $x_{iB}$ ) UFC/g	Resultado Log <sub>10</sub> A $y_{iA}=\log_{10}(x_{iA})$	Resultado Log <sub>10</sub> B $y_{iB}=\log_{10}(x_{iB})$	Diferencia Absoluta $ y_{iA}-y_{iB} $	Diferencia al cuadrado $ y_{iA}-y_{iB} ^2$
1	$8,8 \times 10^4$	$2,8 \times 10^5$	4,9454	5,4400	0,4947	0,2447
2	$1,1 \times 10^5$	$7,5 \times 10^4$	5,0590	4,8777	0,1813	0,0329
3	$1,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	5,1992	5,3050	0,1058	0,0112
4	$1,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	5,0342	5,2951	0,2609	0,0681
5	$2,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	5,3165	5,2910	0,0255	0,0007
6	$2,6 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	5,4150	5,6918	0,2768	0,0766
7	$1,1 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	5,0305	5,5027	0,4722	0,2230
8	$2,3 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	5,3548	5,4610	0,1062	0,0113
9	$1,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	5,1376	5,4400	0,3025	0,0915
10	$1,6 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	5,2139	5,3146	0,1008	0,0102
11	$1,9 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	5,2767	5,2704	0,0063	0,0000
12	$2,7 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	5,4328	5,4811	0,0482	0,0023

*Nota:* No. = Número de muestra de laboratorio. Formato adaptado de ISO (2021).

Con los datos de la Tabla 13, y aplicando la Fórmula 2, se obtuvo el valor de la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio, de la siguiente manera:

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2 * 12} \sum_{i=1}^{12} (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2 * 12} * 0.77}$$

$$S_{IR} = 0.18$$

El criterio de aceptabilidad implica que:  $S_{IR} \leq 2 * S_R$ , siendo  $S_R$  la desviación típica de la reproducibilidad interlaboratorio reportado en la norma ISO 4833-1 con un valor de 0.45. Por tanto, se tiene que:  $0.18 \leq 0.9$ , con lo que se cumple la condición y queda verificada la implementación del método en el laboratorio usuario.

### ***Verificación de productos***

De los seis inóculos preparados para alcanzar el rango de contaminación de los alimentos en el laboratorio usuario, se consideraron tres para el reporte de resultados:  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  para ajo y frutilla, mientras que  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  para el pienso, con la intención de definir tres niveles de contaminación: alto, medio y bajo, respectivamente. De cada uno, se tomaron en cuenta los resultados de las diluciones que presentaban valores contables entre 10 y 300 colonias, se aplicó la Fórmula 1 para conseguir valores corregidos del conteo para las dos diluciones críticas consideradas en cada caso, y a continuación, se reportaron los resultados en la Tabla 14, incluyendo los valores del conteo de las respectivas suspensiones de inóculos para establecer directamente la comparación y definir si la característica de desempeño cumple o no con el criterio de aceptación.

**Tabla 14***Resultado del procedimiento de verificación de productos*

<b>Muestra de análisis</b>	<b>Resultado conteo log<sub>10</sub> UFC/g</b>	<b>Resultado promedio Alimento contaminado artificialmente log<sub>10</sub> UFC/g o UFC/ml</b>	<b>Alimento contaminado artificialmente log<sub>10</sub> UFC/ porción de ensayo</b>	<b>Suspensión de inóculo sin alimento log<sub>10</sub> UFC/ml</b>	<b>eBias</b>
F10 <sup>-2</sup> A	6,0378	6,0046	7,0046	6,5088	0,4958
F10 <sup>-2</sup> B	5,9714				
F10 <sup>-4</sup> A	3,0117	2,9312	3,9312	4,4299	0,4987
F10 <sup>-4</sup> B	2,8507				
F10 <sup>-6</sup> A	1,9031	1,8010	2,8010	2,7324	0,0686
F10 <sup>-6</sup> B	1,6990				
A10 <sup>-2</sup> A	6,1259	5,8180	6,8180	6,5088	0,3092
A10 <sup>-2</sup> B	5,5101				
A10 <sup>-4</sup> A	3,0078	2,9721	3,9721	4,4299	0,4578
A10 <sup>-4</sup> B	2,9363				
A10 <sup>-6</sup> A	1,9542	1,9771	2,9771	2,7324	0,2447
A10 <sup>-6</sup> B	2,0000				
P10 <sup>-2</sup> A	4,2163	4,2210	5,2210	5,4073	0,1863
P10 <sup>-2</sup> B	4,2258				
P10 <sup>-3</sup> A	2,8219	2,9317	3,9317	4,4299	0,4982
P10 <sup>-3</sup> B	3,0414				
P10 <sup>-4</sup> A	2,3222	2,4670	3,4670	3,9586	0,4916
P10 <sup>-4</sup> B	2,6118				

*Nota:* La columna “muestra de análisis” indica la etiqueta usada durante el ensayo, la primera letra representa el alimento ensayado: F para frutilla, A para ajo y P para pienso; el número siguiente representa el nivel de inóculo usado; y la letra final indica la porción de análisis: A o B.

Para que el sesgo estimado se acepte, la diferencia absoluta entre las celdas correspondientes al alimento contaminado artificialmente y la suspensión del inóculo sin alimento, debe dar un resultado menor o igual a  $0.5 \log_{10}$ , lo cual se cumple en todos los casos (columna eBias de la Tabla 14), por lo tanto, la verificación de productos queda satisfecha.

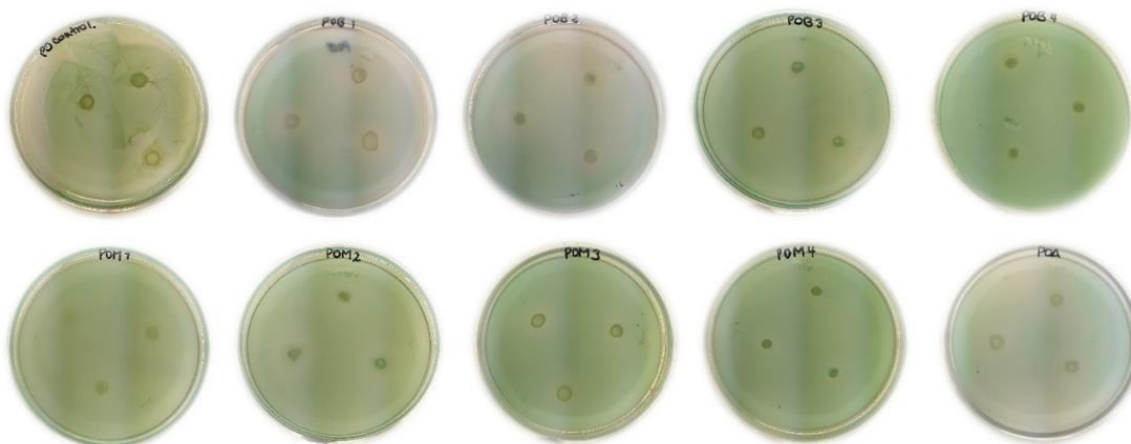
#### **Verificación del método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.**

##### ***Verificación de implementación***

Puesto que el proceso es largo y no en todas las etapas se evidenciaron resultados visibles, se reportan los resultados más significativos del proceso, en este sentido, en la Figura 19 se puede observar los cultivos de enriquecimiento selectivo. Las fotos fueron tomadas aproximadamente después de 48 h adicionales al cumplimiento del tiempo de incubación, por lo que el crecimiento sospechoso se ve expandido por toda la placa en todas las placas.

#### **Figura 19**

##### ***Resultado del enriquecimiento selectivo en agar MSR/V***



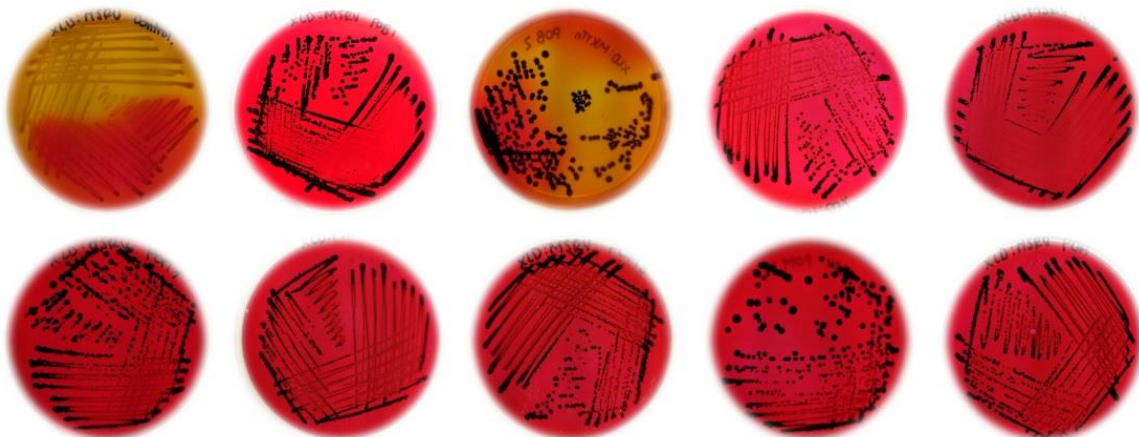
**Nota.** Las imágenes se encuentran ordenadas por filas de izquierda a derecha de la siguiente manera: POControl, POB1, POB2, POB3, POB4, POM1, POM2, POM3, POM4, POA.

En la Figura 20 se puede observar los cultivos puros seleccionados de cada combinación para proceder a realizar las pruebas bioquímicas de confirmación.



**Figura 20**

*Cultivos puros obtenidos de la fase de aislamiento selectivo para la detección de Salmonella spp. en la verificación de implementación*

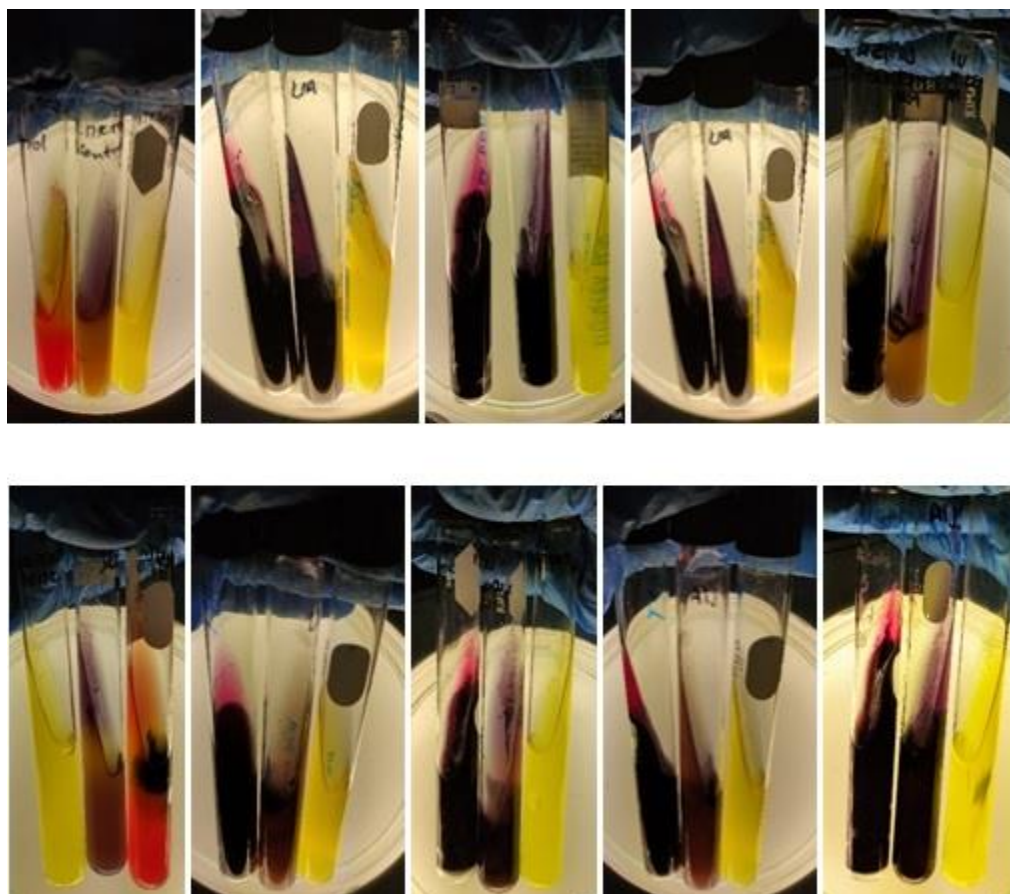


*Nota.* Las imágenes se encuentran ordenadas por filas de izquierda a derecha de la siguiente manera: POControl, POB1, POB2, POB3, POB4, POM1, POM2, POM3, POM4, POA.

Las pruebas bioquímicas se realizaron en aquellas placas que presentaron crecimiento sospechoso y en las que se disponía de colonias bien aisladas como las de la Figura 20. Las triadas correspondientes a las pruebas de confirmación obligatorias, se encuentran ordenadas en la Figura 21.

**Figura 21**

*Pruebas bioquímicas para detección de Salmonella spp. en verificación de implementación*



*Nota:* Las imágenes muestran las tres pruebas bioquímicas obligatorias para la confirmación de *Salmonella* spp. ordenadas de la siguiente manera: TSI, LIA y Agar Urea. El orden por filas de izquierda a derecha corresponde a las muestras de la Figura 20.

El color rojizo en la parte inclinada del agar TSI indica resultados negativos para la fermentación de lactosa y sacarosa; el color amarillo en la parte profunda indica fermentación de glucosa; el color negro es indicativo de la formación de  $H_2S$  y la ruptura del agar revela la formación de gas de glucosa. El color morado en el agar LIA es un resultado positivo para la descarboxilación de la lisina. El color amarillo en el medio agar urea es un resultado negativo para la descomposición de la urea.

Las características mencionadas anteriormente corresponden a cultivos típicos de *Salmonella* spp. Basándose en lo expuesto, se reportaron los resultados descritos en la Tabla 15 para el análisis del pollo, confirmando la presencia del microorganismo de estudio en las muestras cuyos resultados cumplen con dichas características.

**Tabla 15**

*Resultados para la verificación de implementación en la detección de Salmonella spp.*

No.	Muestra	Combinación procedente	A.G.	G.G.	A.L.	A.S.	H <sub>2</sub> S	Urea	Lisina
1	POControl	SS-MKTTn	+	-	-	-	-	-	-
2	POB1	XLD-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
3	POB2	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
4	POB3	XLD-MSRV	+	+	-	-	+	-	+
5	POB4	SS-MKTTn	+	+	+	+	+	-	-
6	POM1	XLD-MKTTn	+	-	-	-	+	-	-
7	POM2	XLD-MSRV	+	+	-	-	+	-	+/-
8	POM3	XLD-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
9	POM4	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+/-
10	POA	XLD-MSRV	+	+	-	-	+	-	+

*Nota:* A.G. = Ácido de glucosa, G.G. = Gas de glucosa, A.L. = Ácido de lactosa, A.S. = Ácido de sacarosa.

De las 10 repeticiones analizadas, se realizó un conteo de aquellas que fueron identificadas como *Salmonella* spp., obteniendo como resultado: 0/1 en el control, 3/4 en las muestras inoculadas con nivel bajo, 3/4 en las muestras inoculadas con nivel medio y 1/1 en la muestra inoculada en el nivel alto. Con estos resultados, nos dirigimos a la guía publicada en la norma ISO 16140-3 y se determinó un valor del límite de detección estimado de: 2.22 UFC/porción de ensayo. El criterio de aceptación implica que el valor obtenido sea de máximo cuatro veces el valor del límite de detección reportado en el estudio de validación,

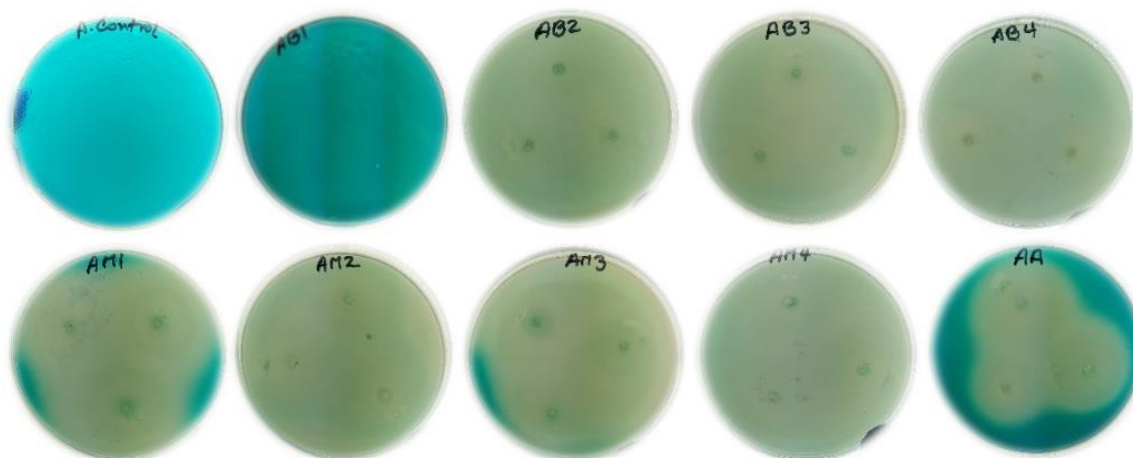
correspondiente a un valor de 2.2 UFC/porción de ensayo, por lo tanto, el resultado se acepta y la verificación de implementación se cumple.

### **Verificación de productos**

Al igual que en la verificación de la implementación del método, en esta sección se reportan los resultados más significativos de todo el procedimiento de verificación de productos. En la Figura 22, Figura 23 y Figura 24 se pueden observar los cultivos de enriquecimiento selectivo para ajo, frutilla y pienso, respectivamente.

### **Figura 22**

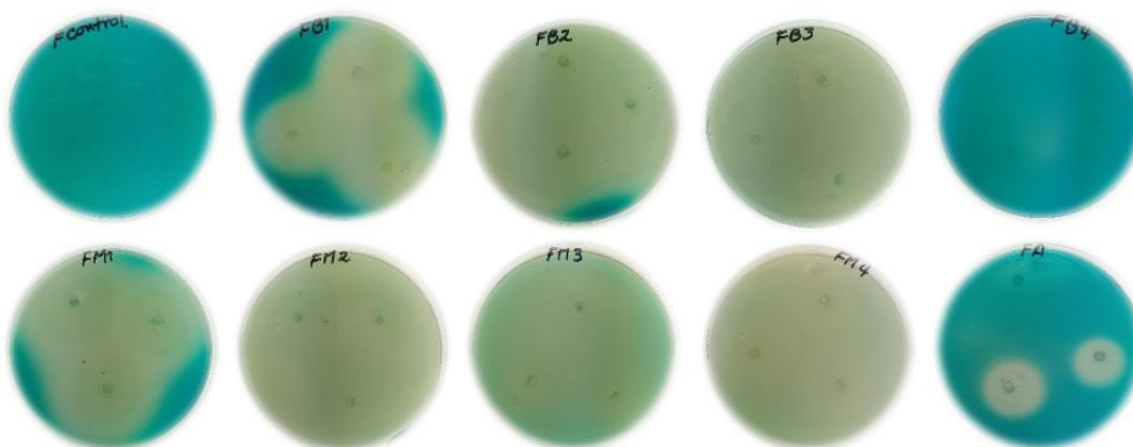
*Resultado del enriquecimiento selectivo en agar MSRv: ajo*



*Nota.* Las imágenes se encuentran ordenadas por filas de izquierda a derecha de la siguiente manera: AControl, AB1, AB2, AB3, AB4, AM1, AM2, AM3, AM4, AA.

**Figura 23**

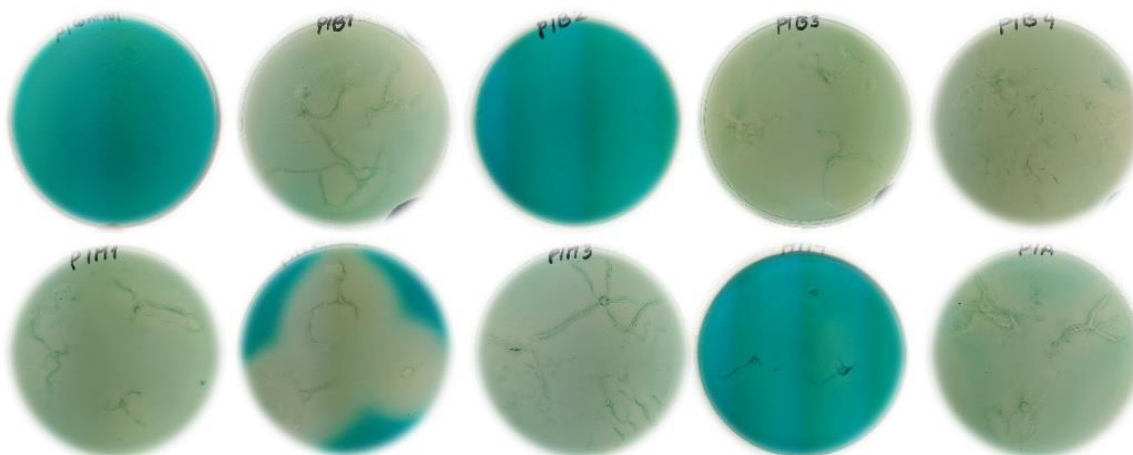
*Resultado del enriquecimiento selectivo en agar MSRv: frutilla*



*Nota.* Las imágenes se encuentran ordenadas por filas de izquierda a derecha de la siguiente manera: FControl, FB1, FB2, FB3, FB4, FM1, FM2, FM3, FM4, FA.

**Figura 24**

*Resultado del enriquecimiento selectivo en agar MSRv: pienso*

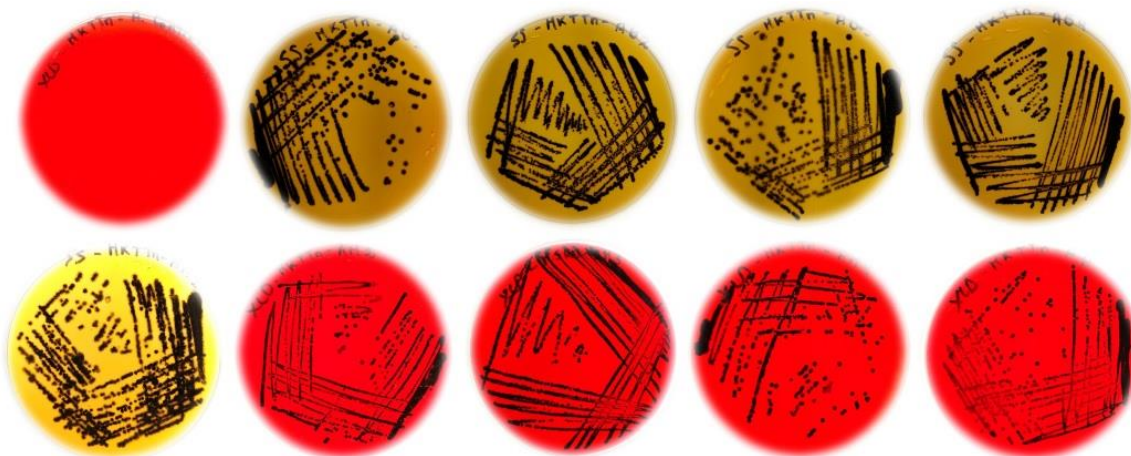


*Nota.* Las imágenes se encuentran ordenadas por filas de izquierda a derecha de la siguiente manera: PIControl, PIB1, PIB2, PIB3, PIB4, PIM1, PIM2, PIM3, PIM4, PIA.

Los cultivos puros seleccionados de cada combinación del aislamiento selectivo se muestran en la Figura 25, Figura 26 y Figura 27, para ajo, frutilla y pienso, respectivamente.

**Figura 25**

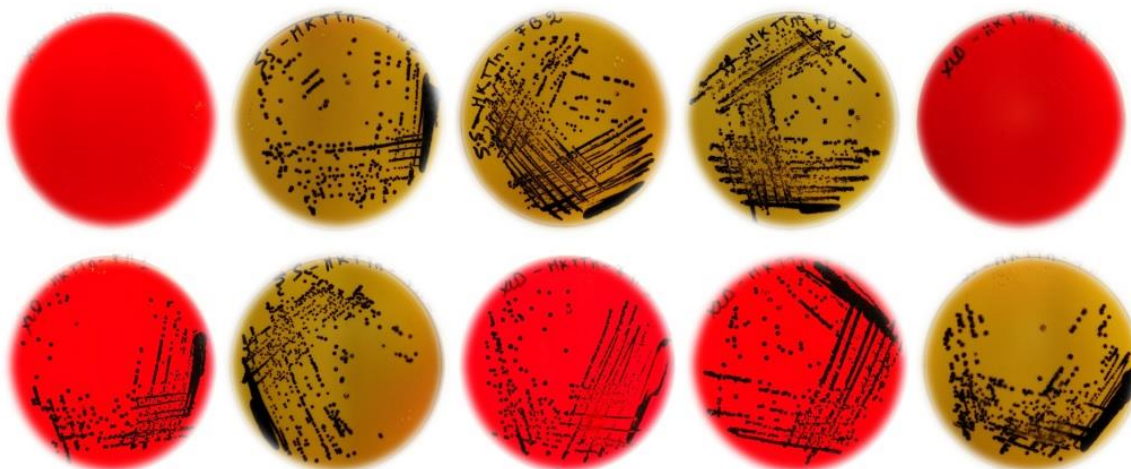
*Cultivos puros obtenidos de la fase de aislamiento selectivo para la detección de Salmonella spp. en la verificación de productos: ajo*



*Nota.* Las imágenes se encuentran ordenadas por filas de izquierda a derecha de la siguiente manera: AControl, AB1, AB2, AB3, AB4, AM1, AM2, AM3, AM4, AA.

**Figura 26**

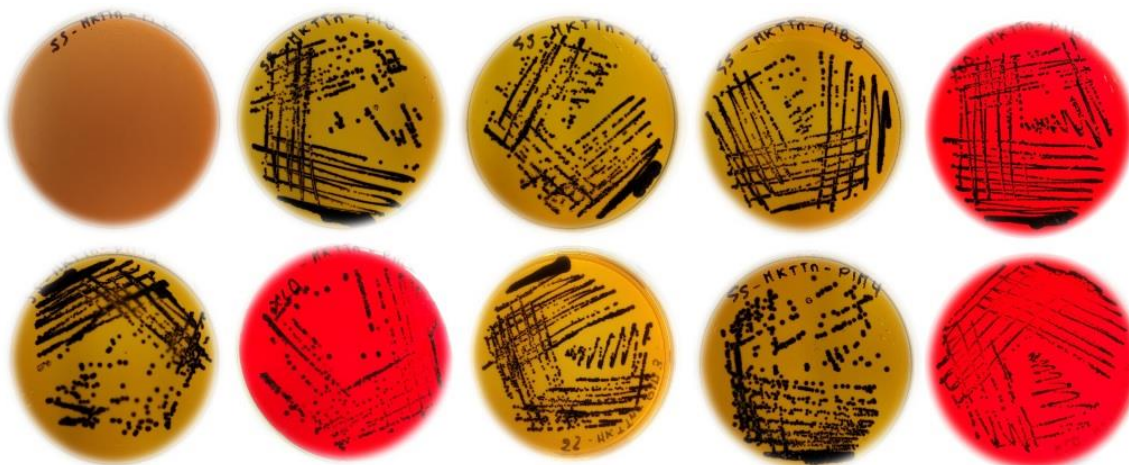
*Cultivos puros obtenidos de la fase de aislamiento selectivo para la detección de Salmonella spp. en la verificación de productos: frutilla*



*Nota.* Las imágenes se encuentran ordenadas por filas de izquierda a derecha de la siguiente manera: FControl, FB1, FB2, FB3, FB4, FM1, FM2, FM3, FM4, FA.

**Figura 27**

*Cultivos puros obtenidos de la fase de aislamiento selectivo para la detección de Salmonella spp. en la verificación de productos: pienso*



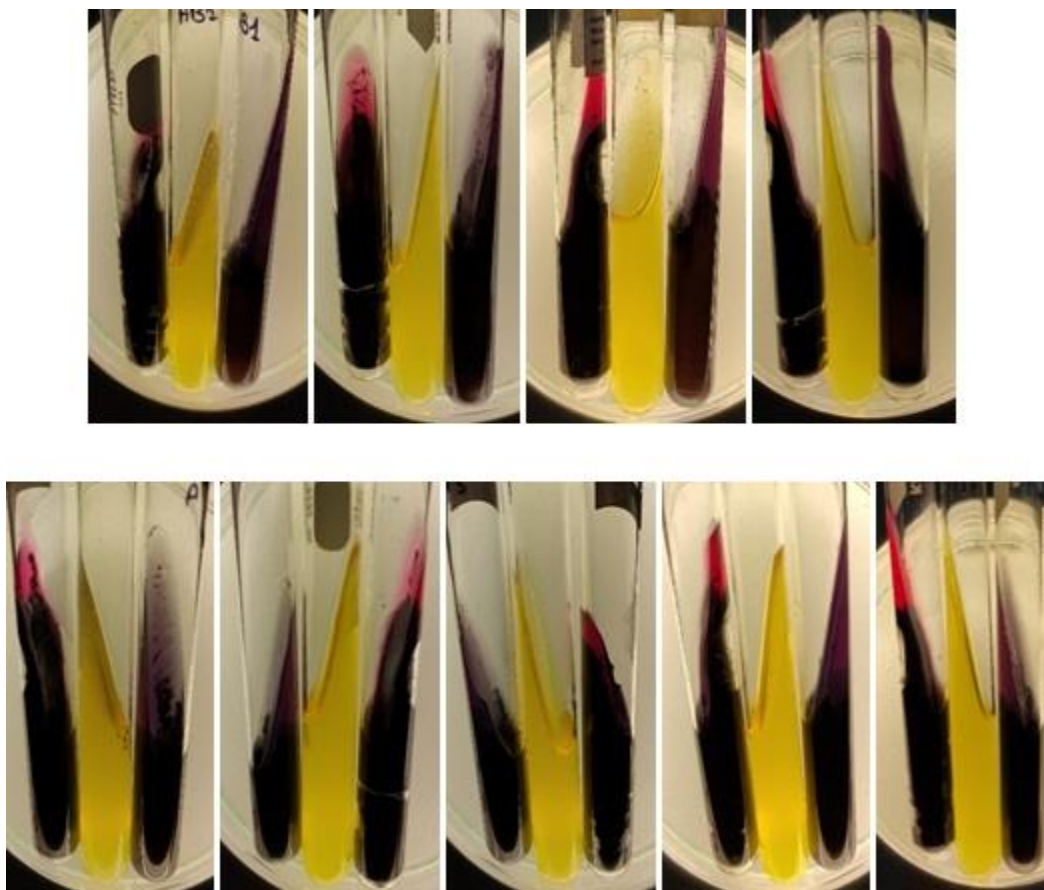
*Nota.* Las imágenes se encuentran ordenadas por filas de izquierda a derecha de la siguiente manera: PIControl, PIB1, PIB2, PIB3, PIB4, PIM1, PIM2, PIM3, PIM4, PIA.

Las pruebas bioquímicas se realizaron solo en aquellas placas que presentaron crecimiento sospechoso y en las que se disponía de colonias bien aisladas. Las triadas correspondientes a las pruebas de confirmación obligatorias, se encuentran ordenadas en la Figura 28, Figura 29 y Figura 30, para ajo, frutilla y pienso, respectivamente.

Los cultivos a los que no se les aplicaron pruebas de confirmación fueron los provenientes de los controles, ya que ninguna placa presentó crecimiento en los agares selectivos. Adicionalmente, en el caso de la frutilla tampoco se hicieron las pruebas de confirmación en la muestra FB4, ya que al igual que los controles, no presentó crecimiento.

**Figura 28**

*Pruebas bioquímicas para detección de Salmonella spp. en verificación de productos: ajo*

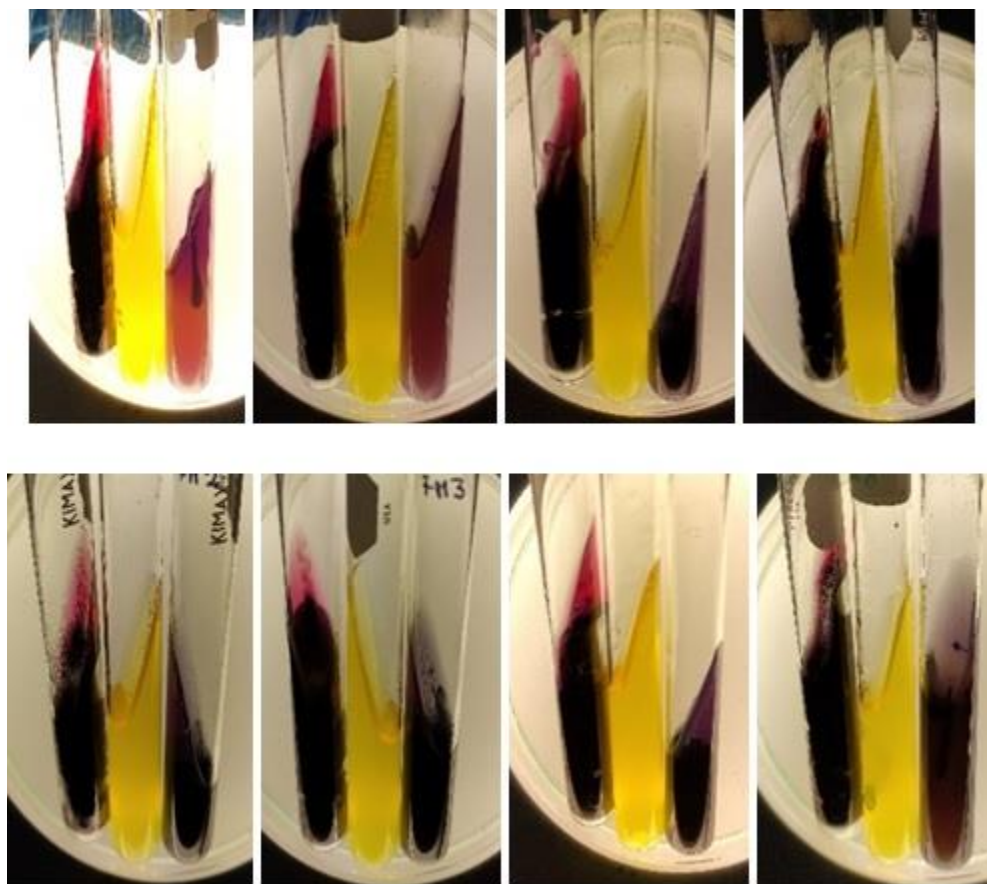


*Nota:* Las imágenes muestran las tres pruebas bioquímicas obligatorias para la confirmación de *Salmonella* spp. ordenadas de la siguiente manera: TSI, Agar Urea y LIA. El orden por filas de izquierda a derecha corresponde a las muestras de la Figura 25, sin considerar la muestra control que no presentó crecimiento.



**Figura 29**

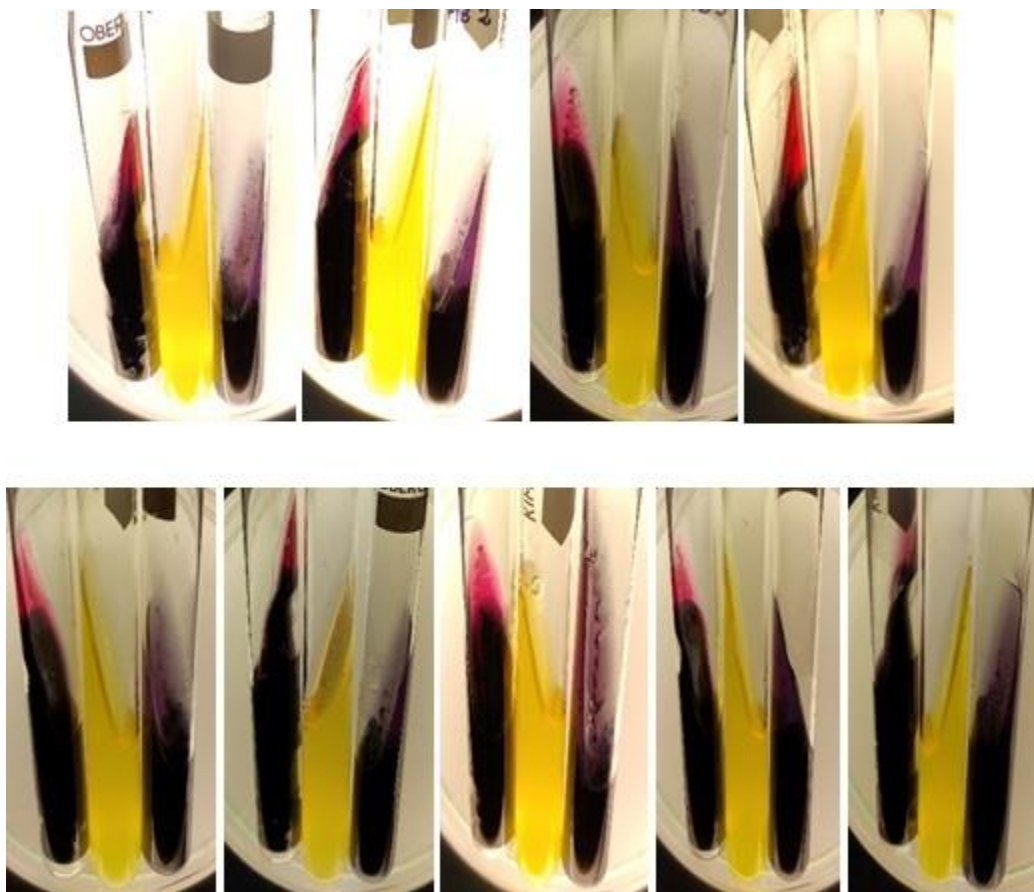
*Pruebas bioquímicas para detección de Salmonella spp. en verificación de productos: frutilla*



*Nota:* Las imágenes muestran las tres pruebas bioquímicas obligatorias para la confirmación de *Salmonella* spp. ordenadas de la siguiente manera: TSI, Agar Urea y LIA. El orden por filas de izquierda a derecha corresponde a las muestras de la Figura 26, sin considerar la muestra control y FB4 que no presentaron crecimiento.

**Figura 30**

*Pruebas bioquímicas para detección de Salmonella spp. en verificación de productos: pienso*



*Nota:* Las imágenes muestran las tres pruebas bioquímicas obligatorias para la confirmación de *Salmonella* spp. ordenadas de la siguiente manera: TSI, Agar Urea y LIA. El orden por filas de izquierda a derecha corresponde a las muestras de la Figura 27, sin considerar la muestra control que no presentó crecimiento.

Del mismo modo que en la verificación de implementación, se reportaron los resultados considerando las características que presentan los cultivos típicos de *Salmonella* spp. y se describen en la Tabla 16, Tabla 17 y Tabla 18, para ajo, frutilla y pienso, respectivamente.

Tabla 16

Resultados de la verificación de productos para la detección de *Salmonella* spp.: ajo

No.	Muestra	Combinación procedente	A.G.	G.G.	A.L.	A.S.	H <sub>2</sub> S	Urea	Lisina
1	AControl	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	AB1	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
3	AB2	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
4	AB3	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
5	AB4	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
6	AM1	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
7	AM2	XLD-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
8	AM3	XLD-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
9	AM4	XLD-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
10	AA	XLD-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+

Nota: A.G. = Ácido de glucosa, G.G. = Gas de glucosa, A.L. = Ácido de lactosa, A.S. = Ácido de sacarosa.

Tabla 17

Resultados de la verificación de productos para la detección de *Salmonella* spp.: frutilla

No.	Muestra	Combinación procedente	A.G.	G.G.	A.L.	A.S.	H <sub>2</sub> S	Urea	Lisina
1	FControl	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	FB1	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+/-
3	FB2	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+/-
4	FB3	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
5	FB4	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
6	FM1	XLD-MKTTn	+	+	+	+	+	-	+
7	FM2	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
8	FM3	XLD-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
9	FM4	XLD-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
10	FA	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+

Nota: A.G. = Ácido de glucosa, G.G. = Gas de glucosa, A.L. = Ácido de lactosa, A.S. = Ácido de sacarosa.

**Tabla 18**

*Resultados en la verificación de productos para la detección de Salmonella spp.: pienso*

No.	Muestra	Combinación procedente	A.G.	G.G.	A.L.	A.S.	H <sub>2</sub> S	Urea	Lisina
1	PIControl	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	PIB1	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
3	PIB2	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
4	PIB3	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
5	PIB4	XLD-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
6	PIM1	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
7	PIM2	XLD-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
8	PIM3	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
9	PIM4	SS-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+
10	PIA	XLD-MKTTn	+	+	-	-	+	-	+

*Nota:* A.G. = Ácido de glucosa, G.G. = Gas de glucosa, A.L. = Ácido de lactosa, A.S. = Ácido de sacarosa.

Para los alimentos analizados se obtuvieron los resultados resumidos en la Tabla 19.

**Tabla 19**

*Resumen de resultados para la detección de Salmonella spp. en la verificación de productos*

Alimento	Nivel de inóculo			Control
	alto	medio	bajo	
<b>Ajo</b>	1/1	4/4	4/4	0/1
<b>Frutilla</b>	1/1	3/4	3/4	0/1
<b>Pienso</b>	1/1	4/4	4/4	0/1

Con estos resultados, nos dirigimos a la guía publicada en la norma ISO 16140-3 y se determinó un valor del límite de detección estimado de: <0.89 UFC/porción de ensayo, 0.44 UFC/porción de ensayo y <0.89 UFC/porción de ensayo para ajos, frutillas y pienso, respectivamente. El criterio de aceptación implica que el valor obtenido sea de máximo cuatro

veces 1 UFC/porción de ensayo, por lo tanto, el resultado se acepta y la verificación de productos se cumple.

## Capítulo V: Discusión

La nueva norma ISO 16140-3 constituye un aporte importante para la realización de procesos de verificación en laboratorios de ensayo dirigidos al análisis microbiológico de alimentos. Su correcto entendimiento, facilita su aplicación y acelera los procesos de acreditación para la aplicación de métodos de referencia en laboratorios que quieren acceder a este tipo de reconocimiento en cumplimiento con la norma ISO/IEC 17025, para lo cual, se deben comprobar una serie de requisitos previos, iniciando con el estudio del alcance de las actividades que pueden cumplirse por parte del laboratorio, considerando los requisitos para la aplicación del método escogido. En este estudio se inició seleccionando los métodos a ser verificados, y a continuación se determinó el cumplimiento del resto de requerimientos necesarios para llevar a cabo todas las actividades de verificación.

Un verdadero juicio acerca de la conformidad sobre el desempeño de los requisitos es proporcionado por el SAE, sin embargo, desde la experiencia y la información recolectada se determinó que el requerimiento de personal queda satisfecho debido a que todos los trabajadores se encuentran capacitados y son competentes para realizar las funciones a las que fueron destinados.

El requerimiento de instalaciones y condiciones ambientales, se acepta ya que el laboratorio se encuentra dispuesto de tal manera que se tiene un área diferente para cada actividad a realizar y cuenta con características que permiten su correcta ejecución, incluyendo las de limpieza. Además, el registro de los datos de la temperatura aportó información complementaria, ya que como menciona la norma UNE EN ISO (2007), este debe variar entre los 18 °C y 27 °C, lo que se comprueba al observar el gráfico de control de la Figura 15 donde la curva muestra un comportamiento tanto dentro de los límites de control como de especificación. En cuanto al control microbiológico del ambiente, la Organización de las

Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO] (1992) menciona que obtener más de 15 UFC/placa indica que la calidad microbiológica del aire no es apta para realizar análisis en el laboratorio microbiológico de control de alimentos, por lo que los valores obtenidos se consideraron dentro del límite permitido.

El requerimiento de equipamiento se cumple para todos los equipos según las especificaciones descritas en cada norma. Empezando por los equipos de funcionamiento en frío, se tiene que el congelador mantuvo un comportamiento controlado a una temperatura inferior a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  en todo momento cumpliendo con lo dispuesto por la UNE EN ISO (2007). Respecto a los refrigeradores, se puede observar que de manera general ambos presentan un funcionamiento controlado, sin embargo, según Gutiérrez & De la Vara (2009) la presencia de un punto fuera de los límites de control, corresponde a un funcionamiento inestable donde están presentes causas especiales de variación, mismas que deben ser corregidas para mantener estabilidad en el proceso. En este caso, en la Figura 4 se observa que a pesar de que hay puntos fuera de los límites de control, todos los puntos caen dentro de los límites de especificación, por lo que se aprobó el uso de este equipo. Por otro lado, en la Figura 5 se observan dos puntos fuera de los límites de control, pero también existe un punto adicional que sobrepasa el límite superior de especificación. Al considerar las posibles causas, se determinó que los puntos corresponden a los días en que hay más actividad en el laboratorio, por lo que los equipos se abren y cierran por periodos prolongados afectando su funcionamiento controlado.

Continuando con los equipos de incubación, se observa que todos funcionan dentro de los límites de especificación, excepto la incubadora regulada para funcionar a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , cuyo gráfico de control muestra un punto por encima del límite superior de control, lo que implica un funcionamiento inestable (Gutiérrez & De la Vara, 2009). Debido a que durante los últimos días

de control de temperatura la incubadora a 37 °C fue usada con mucha frecuencia, se atribuye que esta fue la causa especial de variación.

En el caso del baño termostático, se comprobó que la temperatura fuera estable y homogénea, por lo que se consideraron los 10 puntos de toma de medidas de la Figura 1. UNE EN ISO (2007) establece que se pueden aceptar errores máximos de hasta  $\pm 0.5$  °C, que pueden variar según lo estipulado en cada método. En este caso, los métodos de referencia seleccionados, establecen dos rangos de temperaturas para los diferentes medios de cultivo que se utilizan, y los datos recopilados mostraron que la variación se encuentra dentro de dicho rango, por lo que se comprobó su correcto funcionamiento para el uso previsto.

El funcionamiento de la balanza se determinó de acuerdo al criterio mencionado por UNE EN ISO (2007), que acepta errores máximos de hasta el 1% en el pesaje de muestras. Si se considera a cada pesa utilizada en el ensayo como una muestra, se obtienen los resultados de la Tabla 8. Durante el ensayo, la balanza fue utilizada para pesar las porciones de ensayo y los componentes para los medios de cultivo. En el caso de las porciones de ensayo, los métodos requieren masas de 10 g y 25 g, para el peso de 10 g el criterio se cumple, pero no se tenía disponible una pesa que permita comprobar que se cumple para los 25 g, sin embargo, debido a que todos los valores superiores a partir de 0.05 g se aceptan, asumimos que también se aceptará para una masa de 25 g. En el caso de los componentes para los medios, sí se requirieron masas inferiores a 0.05 g, por lo que se tuvo mucho cuidado al momento de realizar estas mediciones, siendo más estrictos en cuanto a las condiciones de pesaje cuando era necesario. Además, se dio informe de los datos al personal de laboratorio para que se notifique al servicio de mantenimiento preventivo y calibración. El ensayo de excentricidad se incluyó debido a que las masas no siempre se miden en el centro de la balanza, por lo que era necesario determinar si el error obtenido podía ser aceptado o no. Los resultados determinados al



considerar lo descrito en la NCh (2001) mostraron que la balanza sí es capaz de marcar lecturas correctas incluso cuando la masa se coloca en un lugar diferente al centro de pesaje.

Terminando con los equipos, debido a que las condiciones de buen funcionamiento deben ser inspeccionadas por personal calificado competente (UNE EN ISO, 2007), la comprobación del funcionamiento del autoclave se realizó únicamente mediante indicadores químicos que cambiaron de color en cada ciclo de esterilización programado.

La verificación de los medios de cultivo se basó completamente en los parámetros planteados en la norma ISO 11133, ya que también va dirigida a los laboratorios que preparan medios de cultivo a partir de sus componentes individuales. El proceso partió de la realización de cultivos de trabajo en medio TSB, cuya ficha técnica indica que es apto para el crecimiento de microorganismos fastidiosos y no fastidiosos (Becton Dickinson and Company, 2009) entre los que se incluyen las bacterias en estudio, que tras 18 h - 24 h de incubación presentaron valores elevados constantes en la escala de McFarland. La determinación de la pureza mediante tinción Gram se consideró por su capacidad para permitir diferenciar entre bacterias Gram positivas y negativas, de esta forma, se determinó que los tres cultivos fueron puros, pues sus células presentaban características similares entre ellas. En el caso de *E. coli*, se pudieron observar bacilos Gram negativos de tamaño variado lo que según Weng et al (2005) puede explicarse por un tiempo prologado de conservación en estado inactivo. *S. enterica* también se presentó como bacilos Gram negativos, pero de tamaño uniforme. Finalmente, *S. epidermidis*, se presentó como cocos Gram positivos formando racimos, pares y de forma libre, lo cual es un suceso normal para el género *Staphylococcus* según Zhou & Li (2015), pero mencionan que la tendencia va dirigida a la formación de racimos botrioides.

También es importante mencionar en cuanto a los inóculos, que los valores de 0.5 y 1 en la escala de McFarland para *E. coli* y *S. enterica*, respectivamente, se determinaron como los adecuados, en base a ensayos previos mediante la técnica de conteo a profundidad.

Al considerar los criterios de aceptabilidad para el rendimiento de los medios de cultivo, se vio que todos presentaron las características descritas en la norma ISO 11133. En el caso de la solución salina, no se encuentra considerada como diluyente para ser utilizado en muestras de alimentos, sino en el anexo correspondiente al análisis microbiológico de aguas. Pese a esto, el ensayo de rendimiento mostró resultados aceptables semejantes a otros diluyentes utilizados en alimentos, por lo que se continuó utilizándolo, además porque es el diluyente que se emplea en el laboratorio usuario para realizar diferentes ensayos que requieren la preparación de inóculos.

Para el medio MSRV se probó un protocolo de inoculación similar al descrito en la norma ISO 6579-1, ya que en la norma ISO 11133 no se detalla explícitamente un protocolo para medios semisólidos, sin embargo, se exhorta a poner en práctica lo realizado en este ensayo. Lo mismo ocurrió con el medio de confirmación agar urea, para el cual tampoco se detallaban criterios de aceptabilidad en la norma ISO 11133, pese a esto, ya que ISO (2017) menciona que *Salmonella* no hidroliza la urea, se consideró esto como parámetro de aceptación para el rendimiento. En cuanto al cambio de coloración provocado por *S. epidermidis*, MEDIBAC LABORATORIO (2015) menciona que el cambio en la parte superior tras 24 h de incubación y de todo el medio tras 96 h se produce porque ciertos microorganismos tienen un proceso lento de degradación de la urea. Para el resto de medios, sí existía una guía detallada sobre cómo realizar los ensayos correspondientes.

La comprobación del estado de los medios, incluyendo las pruebas de esterilidad no se presentan como resultados, puesto que son muy extensos, pero todo se encuentra registrado para los respectivos informes en el laboratorio usuario.

La selección de alimentos para el ensayo se realizó de acuerdo a lo especificado en la norma ISO 16140-3, entonces, para el método cualitativo cuya norma sí incluía resultados del estudio de validación para diferentes alimentos, se consideró al pollo para la verificación de implementación, ya que además formaba parte del alcance del laboratorio usuario. Para el ensayo de verificación de productos, debido a que el laboratorio cae dentro del alcance para una “gama limitada de alimentos y otras categorías” se consideró la categoría de productos frescos y frutas, haciendo la distinción entre frutas y verduras, por lo que se escogió a las frutillas y los ajos; mientras que dentro de otras categorías se consideró a los piensos. Además de esto, la misma norma indica que los productos escogidos deben ser desafiantes, lo cual se cumple si consideramos que la frutilla es un alimento con un alto contenido de polifenoles (Oviedo-Solís et al., 2018) y de microbiota de fondo provocada por su cercano contacto con la tierra. En el caso del ajo, este presenta capacidad antimicrobiana debido a la presencia de alicina, que se forma cuando es machacado (Arroyo et al., 2015), y, al igual que la frutilla, presenta un alto contenido de microbiota de fondo por las condiciones de cultivo, lo cual se comprobó con el recuento de microorganismos previo al ensayo de desinfección/esterilización. Finalmente, los piensos se analizaron como requisito obligatorio al formar parte de las “otras categorías” y estar dentro del alcance del laboratorio usuario.

Se decidió utilizar los mismos alimentos seleccionados para el ensayo del método cualitativo en el ensayo del método cuantitativo, puesto que ya se tenía conocimiento del contenido microbiológico inicial y del funcionamiento al aplicar la metodología para la

esterilización, pues, incluir pruebas con otros alimentos implicaba más tiempo del que no se disponía.

El ensayo de esterilización se ejecutó puesto que, como requisito para la verificación de productos en métodos cuantitativos, se debe utilizar contaminación artificial, y ya que la contaminación natural presente en los alimentos era alta, habría sido un problema al momento de realizar el análisis de resultados. Del mismo modo, en el ensayo del método cualitativo, se decidió aplicarlo para evitar contaminación no deseada en la porción de ensayo de control y para que todas las porciones fueran homogéneas.

El protocolo para el ensayo de desinfección y esterilización de los alimentos, se realizó en base a la experiencia en conjunto con revisión bibliográfica, pero no se estandarizó, por lo que no se efectuó un análisis estadístico, además de que no corresponde a los objetivos de este estudio. Se incluyeron técnicas aplicadas en cultivo *in vitro*, combinadas con ciclos de esterilización. El proceso implicó el uso de detergente seguido de una solución desinfectante para incrementar la acción de este último. La concentración de detergente se determinó empíricamente a partir de la concentración estandarizada en varios estudios de cultivo *in vitro*, aumentando su concentración y disminuyendo el tiempo de contacto. La concentración del desinfectante se consideró en un valor de 0.6 %, puesto que concentraciones probadas de hasta 2.5 % no dieron resultado solas, ni en conjunto con el detergente. Además, según Bhojwani & Razdan (1996) el hipoclorito de sodio aplicado en concentraciones entre 0.3 % y 0.6 % descontamina muchos tejidos del material vegetal cuando se lo aplica en tiempos de hasta 30 min. El estudio realizado por Mamani Sánchez & Murillo García (2020), apoya lo anterior, indicando que concentraciones superiores permiten menor contaminación, pero los explantes mueren, mientras que a menor concentración los explantes viven y se mantienen descontaminados. Adicionalmente, el estudio realizado por Tanaro et al. (2019) donde se

contamina artificialmente un alimento para evaluar el efecto del hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones, indica que se obtiene mayor eliminación de microorganismos al aplicarse en concentraciones superiores a 0.05 % con tiempos de exposición prolongados, por lo que un valor de 0.6 % con un tiempo de exposición corto, reduciría gran parte de la contaminación natural evitando efectos tóxicos en los tejidos vegetales (Bhojwani & Razdan, 1996).

Para asegurarse de la eliminación de microorganismos, se decidió incorporar ciclos de esterilización por vapor húmedo mediante el uso de autoclave, utilizando tiempos inferiores a los de cocción para no tentar a la posibilidad de cambios en las propiedades iniciales, a pesar de que Nieto (2014) menciona que los alimentos cocinados a vapor mantienen sus propiedades de sabor, vitaminas, minerales, color y principios aromáticos, alterando mínimamente su forma, textura y consistencia.

La verificación de implementación del método cuantitativo, requirió del descarte de dos grupos de datos, correspondientes a las diluciones más altas obtenidas ya que varias de ellas presentaron valores no permitidos según la UNE EN ISO (2007) en el conteo de colonias. El análisis realizado con los datos restantes, permitió la obtención de un valor que cumple con los límites de aceptabilidad mencionados en la ISO (2021) como se observó en la sección correspondiente de resultados. En este caso la norma ISO 4833-1 mostraba un solo valor para  $S_R$ , si hubiera presentado más, se habría tenido que considerar el menor valor de entre los alimentos ensayados en el estudio de validación y realizar la misma comparación.

Para la verificación de productos, la norma ISO 16140-3 menciona que se deben inocular los alimentos de tal manera que se alcancen valores similares a los obtenidos de forma rutinaria en el laboratorio usuario en tres niveles, más adelante, la misma norma recomienda incluir un rango más amplio en caso de presentarse errores en los resultados de los conteos. Los grupos

de valores reportados en este estudio corresponden a aquellos que sí cumplieron con el criterio de aceptación y que se acercaban mucho a los valores reales que se obtienen en el laboratorio, sin embargo, para obtener valores más precisos se podría utilizar un rango más amplio de inóculos. El rango seleccionado para el pienso fue menor, pues las muestras analizadas correspondían a marcas que se promocionan en el mercado y al ser alimentos procesados presentan niveles inferiores de contaminación natural. Se puede observar en la Tabla 14 que los resultados del sesgo estimado cumplen con el límite de aceptabilidad en cada caso.

En relación al ensayo de verificación del método cualitativo, cabe mencionar que fue organizado para realizarse a lo largo de dos semanas, ya que se requerían de seis días seguidos para poder hacerlo completo. Al respecto, la ventaja fue que el método ofrece una alternativa de refrigeración tras las incubaciones de los dos primeros pasos, la cual se consideró para las muestras pre enriquecidas.

Se escogió utilizar el protocolo 1 proporcionado por la norma ISO 16140-3, ya que no se sabía a ciencia cierta el valor del inóculo que se obtendría para contaminar las muestras. Para esto, los ensayos previos indicaban valores entre 19 y 22 colonias en la dilución  $10^{-7}$ , y entre 7 y 8 colonias en el inóculo de nivel alto, con lo que se logró alcanzar los niveles de inoculación requeridos para las porciones de ensayo. Antes y después de refrigerar, los cultivos pre enriquecidos se ambientaron, para evitar posibles daños en las células.

En la etapa de enriquecimiento selectivo, se decidió inocular tres gotas en el agar MSRVR para aumentar las posibilidades de encontrar crecimiento sospechoso en las placas. En ninguna de las etapas de verificación se pudo hacer un registro fotográfico el mismo día de obtención de los resultados, por lo que el crecimiento en las placas se ve aumentado en las imágenes con respecto a los verdaderos resultados, ya que como menciona UNE EN ISO (2014), pasadas las 24

horas de incubación el medio muestra zonas sospechosas de crecimiento que se extienden en casi toda la placa.

En la etapa de aislamiento selectivo, se tuvo la ventaja de presentar al menos un cultivo puro por cada combinación, a pesar de que el estriado a partir de agar MSR/V se realizó con mucha muestra y varias de las placas no mostraron colonias bien aisladas después del tiempo de incubación. Otro aspecto a tomar en cuenta, es que, en la verificación de implementación, la muestra control sí presentó crecimiento a diferencia de las muestras control de la verificación de productos, donde ninguna placa control mostró ningún tipo de crecimiento. Para que el crecimiento en la placa se considerara sospechoso para *Salmonella* spp., el agar XLD podía presentar colonias transparentes con centro negro o rosadas con centro negro según ISO (2017), mientras que el agar SS podía presentar solo colonias transparentes con centro negro (TM MEDIA, s. f.), a pesar de esto, se aplicaron las pruebas de confirmación al cultivo obtenido en la placa control del pollo, cuyos resultados descartaron la presencia de *Salmonella* spp.

La etapa de confirmación tuvo que ser interpretada cuidadosamente tras respetar los tiempos y condiciones de incubación, puesto que el medio LIA puede presentar resultados falsos negativos si se observa antes de las 24 h, ya que pudo no haber terminado su proceso de cambio de color (Gil, 2019).

Los resultados de los conteos correspondientes a positivos para la detección de *Salmonella* spp. en cada nivel de inoculación para cada alimento analizado, permitieron determinar el límite de detección estimado según la tabla guía proporcionada por la ISO (2021), cuyos valores encontrados cumplían con el límite de aceptabilidad propuesto en la misma, declarando al método verificado.

Este es el primer estudio de verificación realizado en el Laboratorio de Microbiología en la Dirección de Inocuidad de Alimentos de Agrocalidad, por ello, los resultados obtenidos

representan una contribución valiosa para la empresa, pues sirve como evidencia de la capacidad técnica que posee para llevar a cabo los métodos microbiológicos seleccionados y aplicados, para poder disponer de ellos de forma rutinaria. El principal aporte del presente estudio es la facilitación de una metodología base para la realización de futuras actividades de seguimiento como control de calidad interno para el mismo método o métodos diferentes, simplificando ensayos previos necesarios para la correcta aplicación de los mismos.



## Capítulo VI: Conclusiones

La implementación del método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. basado en la ISO 6579-1 y del método horizontal para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos a 30 °C basado en la ISO 4833-1 en diferentes alimentos en el laboratorio de Microbiología de Agrocalidad, se logró mediante la selección de los protocolos adecuados que forman parte de la norma ISO 16140-3, considerando el alcance de aplicación del laboratorio usuario.

Parte del proceso de implementación de métodos de referencia en un laboratorio, consiste en comprobar que se cuenta con todo lo necesario para obtener resultados comparables. En este sentido, se pudo determinar que el laboratorio de Microbiología de Agrocalidad cumple con los requisitos para llevar a cabo los métodos seleccionados, incluyendo: instalaciones, condiciones ambientales, personal y equipamiento.

Los valores de las características de desempeño determinadas en cada método cumplieron con los límites de aceptabilidad, garantizando su verificación y demostrando que el laboratorio cuenta con la competencia técnica para ejecutarlos de manera rutinaria.

## Capítulo VII: Recomendaciones

Repetir el ensayo utilizando más cepas y variando sus condiciones (en cultivos estresados o no estresados), para poder estudiar un alcance más grande de los métodos.

Optimizar un protocolo de desinfección/esterilización bien definido para diferentes productos analizados en el laboratorio usuario, comprobando que sus características iniciales realmente se mantienen al momento de aplicar los métodos de referencia según la metodología proporcionada por la ISO 16140-3, o determinar la influencia de la contaminación natural en los resultados.

Aplicar el ensayo completo para otras categorías de productos que formen parte del alcance del laboratorio como parte de un proceso de control de calidad interno, en este caso también en aguas, y establecer comparaciones con los resultados obtenidos en alimentos.

## Referencias

- Agrocalidad. (s. f.-a). *Agrocalidad*. <https://www.agrocalidad.gob.ec/>
- Agrocalidad. (s. f.-b). *Dirección de Diagnóstico de Inocuidad de los Alimentos y Control de Insumos Agropecuarios - Agrocalidad*. <https://www.agrocalidad.gob.ec/direccion-de-diagnostico-de-inocuidad-de-los-alimentos-y-control-de-insumos-agropecuarios/#>
- Agrocalidad. (4 de junio de 2020). *LA INOCUIDAD DE ALIMENTOS, UN ASUNTO DE TODOS*. <https://www.agrocalidad.gob.ec/la-inocuidad-de-alimentos-un-asunto-de-todos/>
- American Type Culture Collection. (2021a). *Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers 4157*. [file:///C:/Users/usuario/AppData/Local/Temp/4157 Product Sheet - Escherichia coli \(Migula\) Castellani and Chalmers.pdf](file:///C:/Users/usuario/AppData/Local/Temp/4157%20Product%20Sheet%20-%20Escherichia%20coli%20(Migula)%20Castellani%20and%20Chalmers.pdf)
- American Type Culture Collection. (2021b). *Salmonella enterica subsp. enterica (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Typhimurium*. [file:///C:/Users/usuario/AppData/Local/Temp/51812 Product Sheet - Salmonella enterica subsp. enterica \(ex Kauffmann and Edwards\) Le Minor and Popoff serovar Typhimurium-1.pdf](file:///C:/Users/usuario/AppData/Local/Temp/51812%20Product%20Sheet%20-%20Salmonella%20enterica%20subsp.%20enterica%20(ex%20Kauffmann%20and%20Edwards)%20Le%20Minor%20and%20Popoff%20serovar%20Typhimurium-1.pdf)
- American Type Culture Collection. (2021c). *Staphylococcus epidermidis (Winslow and Winslow) Evans*. [file:///C:/Users/usuario/AppData/Local/Temp/12228 Product Sheet - Staphylococcus epidermidis \(Winslow and Winslow\) Evans.pdf](file:///C:/Users/usuario/AppData/Local/Temp/12228%20Product%20Sheet%20-%20Staphylococcus%20epidermidis%20(Winslow%20and%20Winslow)%20Evans.pdf)
- Arriola, L. (11 de septiembre de 2012). *VALIDACIÓN DE MÉTODOS VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS, FÍSICOQUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS*. [https://medicamentos.mspas.gob.gt/Archivos/Descargas/Curso\\_Validación\\_de\\_Métodos\\_Analíticos\\_con\\_formulas.pdf](https://medicamentos.mspas.gob.gt/Archivos/Descargas/Curso_Validación_de_Métodos_Analíticos_con_formulas.pdf)
- Arroyo, L., Landín, L., Alonso, A., Sánchez, M., & Suárez, G. (2015). Actividad inhibitoria de *Allium cepa* y *Allium sativum* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. *Revista*

*Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 1045-1052.

Becton Dickinson and Company. (2009). *Difco & BBL Manual - Manual of Microbiological Culture Media Second Edition* (B. S. Mary Jo Zimbro, D. Power, S. Miller, G. Wilson, & J. Johnson (eds.); Second).

[https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcobbblmanual\\_2nded\\_lowres.pdf](https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcobbblmanual_2nded_lowres.pdf)

Bhojwani, S., & Razdan, M. (1996). Plant Tissue Culture Theory and Practice, a Revised Edition. En *Studies in Plant Science* (Vol. 5, Número C). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0928-3420\(96\)80004-8](https://doi.org/10.1016/S0928-3420(96)80004-8)

Biosait Europe. (8 de febrero de 2019). *Microorganismos mesófilos en alimentos*. <https://biosait.com/microorganismos-mesofilos-alimentos/>

Bordetas, M. del P. (2004). Seguridad alimentaria y certificación como garantía de calidad. *Vida Rural*, 28-30.

Bush, L. (2020). *Infecciones por Escherichia coli*. Manual MSD Versión para público general. <https://www.msmanuals.com/es/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-gramnegativas/infecciones-por-escherichia-coli>

Camaró Sala, M. L., Catalá Cuenca, V., Gimeno Cardona, C., Martínez García, R., & Olmos Martínez, P. (2013). *Procedimientos De Microbiología Clínica - Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos*. (E. Cercenado & R. Cantón (eds.)). seimc.

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (9 de julio de 2020). *La Salmonella y los alimentos*. <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/salmonella-and-food-sp.html>

Gil, M. (8 de febrero de 2019). *Agar LIA (Lisina Hierro): fundamento, preparación y usos*. <https://www.lifeder.com/agar-lia/>

Gutiérrez, H., & De la Vara, R. (2009). *Control Estadístico de Calidad y Seis Sigma* (Segunda).

McGraw-Hill.

Instituto Tecnológico de la Alimentación. (2011, marzo 23). *Métodos de referencia en análisis microbiológicos. ¿QUO VADIS?*. <https://www.ainia.es/insights/metodos-de-referencia-en-analisis-microbiologicos-quo-vadis/>

International Organization for Standardization. (2017). *Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions* (ISO 6887-1:2017).

International Organization for Standardization. (2013). *Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique* (ISO 4833-1:2013).

International Organization for Standardization. (2017). *ISO 6579 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1: Detection of Salmonella spp.* (ISO 6579-1:2017).

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

ISO Tv Intercontinental. (2019). *ISO/IEC 17025 | La selección, verificación y validación del método en un sistema de gestión ISO17025*. <https://www.youtube.com/watch?v=z9PL8AKYjeQ>

Jacobs, W., Van, W., Hazeleger, W., & Jongenburger, I. (2015). *Impact of sample size on the Limit of Detection LOD50 to detect Campylobacter in foods*. <https://www.wur.nl/en/Publication-details.htm?publicationId=publication-way-343935373936>

Mamani Sánchez, B., & Murillo García, R. A. (2020). Micropropagación de dos variedades de frutilla (*Fragaria ananassz Duch.*) en diferentes medios de cultivo. *Revista de Investigación*

*e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 7(1), 69-78.

Mayo Clinic. (11 de octubre de 2019). *Infeción por salmonela*. <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/salmonella/symptoms-causes/syc-20355329>

MEDIBAC LABORATORIO. (2015). *AGAR UREA Medio de cultivo UREA*.

Ministerio de Agricultura y Ganadería. (28 de abril de 2021). *Ecuador fortalece su sistema nacional de inocuidad para producir alimentos saludables*. <https://www.agricultura.gob.ec/ecuador-fortalece-su-sistema-nacional-de-inocuidad-para-producir-alimentos-saludables/>

Norma Chilena. (2001). *Instrumentos de pesaje no automáticos - Parte 1: Requisitos metrológicos y técnicos - Ensayos (N.º 2562)*.

Nieto, C. (2014). Técnicas de cocción: sabor, color, textura y nutrientes a buen recaudo | Farmacia Profesional. *Farmacia Profesional*, 28(4), 15-19.

Organización Internacional de Normalización. (2021). *Microbiología de la cadena alimentaria - Validación de métodos - Parte 3: Protocolo para la verificación de métodos de referencia y alternativos validados aplicados a un laboratorio (ISO 16140-3:2021)*.

Organización Internacional de Normalización. (2015). *ISO 9000:2015(es), Sistemas de gestión de la calidad — Fundamentos y vocabulario*. <https://www.iso.org/obp/ui/es/#iso:std:iso:9000:ed-4:v1:es>

Organización Mundial de la Salud. (30 de abril de 2020). *Inocuidad de los alimentos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

Organización Mundial de la Salud. (7 de febrero de 2018a). *E. coli*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>

Organización Mundial de la Salud. (20 de febrero 2018b). *Salmonella (no tifoidea)*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

- Oviedo-Solís, C. I., Cornejo-Manzo, S., Murillo-Ortiz, B. O., Guzmán-Barrón, M. M., & Ramírez-Emiliano, J. (2018). Los polifenoles de la fresa disminuyen el estrés oxidativo en enfermedades crónicas. *Gaceta Médica de México*, 154, 80-86.  
<https://doi.org/10.24875/GMM.17002759>
- Pascual, M. del R., & Calderón, V. (2000). *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas* (Segunda Ed). Díaz de Santos, S.A.  
[https://books.google.com.ec/books?id=9Elfks8uxMC&printsec=frontcover&dq=Microbiología+Alimentaria:+Metodología+Analítica+para+Alimentos+y+Bebidas&hl=es&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=9Elfks8uxMC&printsec=frontcover&dq=Microbiología+Alimentaria:+Metodología+Analítica+para+Alimentos+y+Bebidas&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Seija, V. (2006). Género *Staphylococcus*. En *TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA Etiopatogenia microbiológica SECCIÓN III* (pp. 257-271).  
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>
- Servicio de Acreditación Ecuatoriano. (2019). *CR GA01 Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración Según NTE INEN-ISO/IEC 17025:2018*. <https://www.acreditacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2019/12/CR-GA01-R06-Criterios-Generales-Acreditación-de-laboratorios-de-ensayo-y-calibración-según-NTE-INEN-ISO-IEC-17025-2018-.pdf>
- Servicio de Acreditación Ecuatoriano. (2020). *DIRECTORIO Organismos de Evaluación de la Conformidad Acreditados 2020 -2021*. <https://online.fliphtml5.com/asyed/roqm/#p=1>
- Servicio Ecuatoriano de Normalización. (2007). *SERVICIO ECUATORIANO DE NORMALIZACION INEN*. LinkedIn. <https://www.linkedin.com/in/servicio-ecuadoriano-de-normalizacion-inen-7a09a5113/?originalSubdomain=ec>
- Silva, M. del C., & García, M. J. (2006). *Técnico Especialista en Laboratorio de Atención Primaria del Instituto Catalán de la Salud. Temario: Vol. I*. MAD, S.L.  
<https://books.google.com.ec/books?id=W4ZvVrtP8eoC&printsec=frontcover&dq=Técnic>

o+Especialista+en+Laboratorio+de+Atención+Primaria+del+Instituto+Catalán+de+la+Salud.+Temario&hl=es&sa=X&redir\_esc=y#v=onepage&q=Técnico Especialista en Laboratorio de Atención

Soledad, B. (2009). *La validación en la Industria*. lulu.com.  
[https://books.google.com.ec/books?id=AR5\\_AgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=La+validación+en+la+Industria&hl=es&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q=La+validación+en+la+Industria&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=AR5_AgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=La+validación+en+la+Industria&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=La+validación+en+la+Industria&f=false)

Tanaro, J., Piaggio, M., & Lound, L. (2019). Lavado y desinfección con hipoclorito de sodio de lechuga contaminada con *Escherichia coli* O157:H7. *Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento*, 9(9), 247-255.

The International Organisation of Vine and Wine. (2005). *Practical guide for the validation, quality control, and uncertainty assessment of an alternative oenological analysis method (OIV-MA-AS1-12:R2005)*. <https://www.oiv.int/public/medias/2755/oiv-ma-as1-12.pdf>

TM MEDIA. (s. f.). *PRODUCT DATA SHEET SALMONELLA SHIGELLA AGAR (SS AGAR)*. [https://www.tmmedia.in/sites/default/files/TM 386.pdf](https://www.tmmedia.in/sites/default/files/TM%20386.pdf)

Tranchard, P. S. (2016). *Nueva norma ISO para validar los métodos de ensayo de microorganismos para la industria alimentaria*. [https://copant.org/phocadownload/iso\\_lt\\_2016/20160621\\_Nueva norma ISO para validar los metodos de ensayo de microorganismos para la industria alimentaria 2.pdf](https://copant.org/phocadownload/iso_lt_2016/20160621_Nueva%20norma%20ISO%20para%20validar%20los%20metodos%20de%20ensayo%20de%20microorganismos%20para%20la%20industria%20alimentaria%202.pdf)

Una Norma Española - Norma Europea - Organización Internacional de Normalización. (2007). *Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal - Requisitos generales y guía para el examen microbiológico (EN ISO 7218:2007)*.

Una Norma Española - Norma Europea - Organización Internacional de Normalización. (2014). *Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua -*



*Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo*  
(UNE-EN ISO 11133:2014).

Velasco, C. (17 de noviembre de 2017). *Validación de técnicas microbiológicas: De qué se trata y cómo aplicarla*. Cercal Group. <https://cercal.cl/validacion-tecnicas-microbiologicas/>

Zhou, X., & Li, Y. (2015). Supragingival Microbes. En *Atlas of Oral Microbiology* (pp. 41-65). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802234-4.00003-3>