

RESUMEN: *El propósito de esta investigación fue la determinación de la carga bacteriana de aerobios mesófilos y coliformes totales mediante la verificación previa de los métodos AOAC 990.12 y 991.14, respectivamente, en alimentos preparados para que con ayuda del programa InfoStat obtener estadísticas descriptivas y gráficos para el análisis exploratorio que permitan al laboratorio CEA conseguir una acreditación o certificación.*

Para la investigación se recolectó cada 15 días de 7 a 8 alimentos al azar incluido un ají del hotel Dann Carlton, hotel Casa Gangotena y Colegio Americano.

Para la verificación de los métodos se utilizó como matriz una muestra de ají seleccionada al azar en los diferentes establecimientos, mismo que se evaluó en tres niveles de concentración bajo parámetros de repetibilidad y reproducibilidad.

En la determinación de la carga bacteriana de cada diez alimentos se sembró por duplicado uno

seleccionado al azar, al obtener un mínimo de treinta datos se graficaron los resultados para aplicar en las cartas de control las reglas de Westgard lo que permitió evaluar el desempeño correcto del método en un periodo de tiempo.

Los resultados obtenidos con ayuda de las pruebas de Duncan y Tukey, nos permitió verificar que la hipótesis planteada se cumple y que gracias a la incertidumbre conseguida menor al 10% indica que los métodos se aplicaron correctamente.

Se identificó que otras posibles fuentes de contaminación en los alimentos, a parte una mala manipulación incorrecta, es causada por superficies mal desinfectadas y por el contacto directo del agua potable en la manipulación y preparación de productos finales.

Palabras clave: Verificación, Aerobios Mesófilos, Coliformes Totales, AOAC.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias, mohos y levaduras son microorganismos transmisores de enfermedades y son primordiales para determinar si los alimentos se encuentran dentro del rango permitido que establece la norma tomada como criterio de aceptabilidad según el método aplicado. Las causas principales de la contaminación de un producto son: las superficies vivas, que implica manos con y sin guante, y superficies inertes como tablas de picar, mesas de trabajo, platos, cubiertos, entre otros [1].

El factor principal que evidencia la contaminación de un alimento pre y post preparado es la manipulación inadecuada de la materia prima al momento de procesarla, porque se genera un aumento de microorganismos a los ya existentes por su naturaleza lo que causa enfermedades gastrointestinales en el ser humano; en otras palabras el modo de vida de las personas influye la calidad de los alimentos [21].

Por otra parte, para obtener un alimento crudo o cocido de calidad éste debe pasar por análisis previos a su elaboración (cuando es materia prima), durante su producción y, finalmente, como producto terminado [1]. Los métodos aplicados por un laboratorio para determinar si existe contaminación microbiológica, garantiza un resultado confiable en esta área y la satisfacción del

cliente con la precaución de evitar poner en riesgo su salud [12].

En base a lo expuesto anteriormente, el Centro Especializado de Análisis "CEA" es un laboratorio que proporciona sus servicios a diferentes empresas; para asegurar la confiabilidad de los resultados en microbiología de alimentos se basa en los métodos de referencia AOAC 990.12 y 991.14 que determinan la carga bacteriana de aerobios mesófilos y coliformes totales lo que asegurara la calidad del examen y proporciona resultados confiables tanto al consumidor como a la empresa que contrata el servicio.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en tres instituciones desde 01 de julio del 2012 hasta el 15 de febrero del 2013.

Gracias a resultados obtenidos en análisis previos de diferentes alimentos que el laboratorio CEA realizó, se los clasificó según su: manipulación, ingredientes, preparación, almacenamiento, limpieza de la materia prima y tiempo de expendio al consumidor.

Para verificar los métodos AOAC 990.12 y 990.14 se requirió seleccionar un alimento al azar considerando su relevancia al ser causante de enfermedades, para lo cual la matriz que se escogió se evaluó en tres niveles de concentración bajo, medio y alto.

DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE AEROBIOS MESÓFILOS Y COLIFORMES TOTALES MEDIANTE LA VERIFICACIÓN PREVIA DE LOS MÉTODOS AOAC 990.12 Y 991.14, RESPECTIVAMENTE, EN ALIMENTOS PREPARADOS. QUITO–ECUADOR, 2012-2013

La verificación de los métodos se realizó mediante la guía internacional AOAC, que toma en cuenta los parámetros de repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, robustez, límite de detección y cuantificación en base a un diseño en bloques completamente al azar; y con el análisis de las muestras inter-laboratorios (laboratorio LASA y BIOLAB) lo que permitió comprobar que se aplicó de forma adecuada el método 990.12 y 991.14.

Se controlaron diferentes factores que influyen directamente en la verificación de los métodos tales como la temperatura de incubación, el tiempo de incubación para leer los resultados, la cantidad de muestra a sembrar en las placas petrífilm, el pesaje de la muestra para mantener la relación con el diluyente de 1:10, los equipos de incubación y al analista que realiza los conteos [11].

Mediante dos siembras del mismo alimento en los medios respectivos para la determinación de aerobios mesófilos y coliformes totales, se valoró el grado de repetibilidad de la carga bacteriana. El criterio de aceptación para este ensayo se determinó durante la verificación con el cálculo de la incertidumbre expandida.

- Verificación del método.

La verificación de los métodos AOAC 990.12 y 990.14 se basan en la guía de la Eurachem, 1998; que indica los pasos y/o procedimiento a seguir para confirmar que los ya validados por estándares de organizaciones y aprobadas como AOAC internacional, son aplicados de manera correcta.

Para la selección de parámetros, niveles y repeticiones se utilizó la matriz seleccionada al azar, ají (denominado de distinta manera), que se prepara de varias maneras y posee ingredientes diferentes en las tres instituciones que se recolectaron en tres fundas estériles que permiten evaluar los niveles bajo, medio y alto de concentración.

Los parámetros a evaluar en el ají recolectado en las tres instituciones, según la Eurachem, se midieron en tres niveles de concentración bajo, medio y alto lo que permitió evaluar al mismo tiempo el límite de

reproducibilidad y repetibilidad cada uno con el número de repeticiones respectivas.

Se utilizó una funda muestreada de ají criollo, manaba y crudo de las tres recolectadas para verificar cada nivel de concentración.

En el nivel bajo de concentración se pesó en un recipiente de vidrio estéril 5 g de muestra (ají criollo, manaba y crudo) con 45 mL de diluyente (caldo nutritivo) y se esterilizó en el autoclave. Posteriormente se sembró en los petrífilm.

Para el nivel medio se sembró la muestra recolectada con diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) para aerobios mesófilos y solamente con (10^{-1}) para coliformes totales y *E. coli*.

Cada una de las fundas recolectadas restantes se dejaron al ambiente en un lugar estéril del laboratorio para que las bacterias se multipliquen de manera normal y se sembró con diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) para aerobios mesófilos y solamente con (10^{-1}) para coliformes totales y *E. coli*.

Para el límite de detección se evaluó haciendo siembra por reproducibilidad, es decir de las diez muestras cinco las sembró un analista y las restantes otra.

Para el límite de cuantificación se evaluó haciendo siembra por repetibilidad, es decir de las diez muestras las sembró un mismo analista.

Por otra parte, para determinar la exactitud se usaron pellets que poseen de 1-10 UFC/pellet de bacterias *Escherichia coli* ATCC 25922 que se sembró en conjunto con una muestra de ají no determinado para obtener una recuperabilidad de la muestra al 100%.

De la misma manera, para el análisis de linealidad se sembró consecutivamente la muestra de ají indistinto más la cepa ATCC 25922 en diluciones que van desde 10^{-1} hasta 10^{-5} .

Como último se realizó un control de calidad interno (CCI) mediante la siembra por duplicado de un alimento seleccionado al azar de cada diez que se muestrean.

DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE AEROBIOS MESÓFILOS Y COLIFORMES TOTALES MEDIANTE LA VERIFICACIÓN PREVIA DE LOS MÉTODOS AOAC 990.12 Y 991.14, RESPECTIVAMENTE, EN ALIMENTOS PREPARADOS. QUITO–ECUADOR, 2012-2013

- Muestreo.

Se recolectó muestras dos veces al mes entre el período agosto 2012 – febrero 2013, con excepción de una en la cual se muestreó una vez cada seis meses.

Las muestras seleccionadas fueron al azar entre alimentos crudos y cocidos, jugos, ensaladas, vinagretas y materia prima, pero con una muestra de ají obligatoriamente que se utilizó como matriz para la verificación del método.

El transporte se realizó en cadena de frío en un recipiente con hielo, se almacenaron las muestras según su naturaleza evitando su rotura o deterioro, en el menor tiempo posible llegaron al laboratorio, con el control de temperatura y tiempo, y así evitar la multiplicación de bacterias, de esta manera los resultados reflejan la flora que, cualitativamente y cuantitativamente, estaba presente en el alimento al momento del muestreo.

Una vez en el laboratorio, se escribieron los datos de cada muestra en el registro interno de trabajo de alimentos con el código correspondiente de cada alimento.

A continuación se realizó la trituración de alimentos sólidos cuidando la integridad de los mismos para evitar la destrucción de los gérmenes por ruptura de la membrana.

Para pesar la muestra con exactitud y evitar la manipulación excesiva se procedió a esterilizar un frasco de vidrio con el que se encerró la balanza previamente.

Segundo, asépticamente se pesó la muestra (manteniendo la relación 1:10 con el diluyente) 10 ± 0.1 g de muestra representativa dentro del recipiente estéril y se agregó 90 mL de diluyente, como lo muestra la tabla 2.2 para la relación peso-diluyente de la muestra [11].

Por último se homogenizó la muestra por un lapso de un minuto a velocidad media con agitación suave [11].

Previo a la siembra de la muestra, se rotularon las membranas petrifilm, para microorganismos aerobios mesófilos y *E.*

coli-coliformes totales, con el código de la muestra y dilución correspondiente [11].

Para sembrar en las membranas ya rotuladas se levantó la laminilla de plástico y se inoculó un mililitro de acuerdo a lo descrito en la tabla 2.2, evitando la formación de burbujas de aire, se procedió a bajarla y se colocó el aplicador con la cara lisa hacia arriba en el centro de la placa ejerciendo fuerza para que la muestra se distribuya uniformemente antes de que se forme el gel [11].

Se retiró el aplicador después de un minuto para permitir que solidifique el gel; se procedió a incubar las membranas en posición horizontal, cara arriba, en pilas 20 a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 3 horas como lo especifica la norma AOAC, con un vaso de precipitación lleno de agua destilada lo cual humidifica la incubadora y favorece el crecimiento de las bacterias [11].

Se realizó un mínimo de dos diluciones para cada uno de los métodos; en el caso de ser necesario se diluyó la muestra hasta 10^{-5} principalmente para obtener un conteo dentro de parámetros para el nivel alto [11].

Finalmente, al momento de realizar el conteo de colonias para aerobios mesófilos se seleccionaron membranas que presentaban un rango de conteo entre 30 y 300 colonias, mientras que para coliformes totales las colonias debían encontrarse en un rango de 15 a 150 colonias las mismas que se expresaron en UFC/g [11].

- Análisis de datos.

Para analizar los valores obtenidos, se hizo uso del programa estadístico InfoStat en el cual, se realiza un histograma que permite evaluar la reproducibilidad en el ají criollo, crudo y manaba en sus tres niveles de concentración e identifica de manera visual si existe una diferencia significativa entre las medias entre los dos analistas.

El análisis de varianza para reproducibilidad se realiza por medio de las pruebas de Tukey y Duncan que permiten corroborar con datos estadísticos, evidencia objetiva, si las medias entre los analistas son o no diferentes.

DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE AEROBIOS MESÓFILOS Y COLIFORMES TOTALES MEDIANTE LA VERIFICACIÓN PREVIA DE LOS MÉTODOS AOAC 990.12 Y 991.14, RESPECTIVAMENTE, EN ALIMENTOS PREPARADOS. QUITO–ECUADOR, 2012-2013

Al momento de evaluar repetibilidad el diagrama de puntos nos permitirá observar gráficamente sólo la diferencia de medias entre el ají criollo, manaba y crudo ya que es un único analista quien realiza las repeticiones y por dicho motivo no es necesario realizar las pruebas de Tukey y Duncan.

Una vez que se identifica en reproducibilidad y repetibilidad que existe diferencia entre las medias de los tres ajíes se procederá a realizar la prueba de F o Fisher que comprueba por medio del cálculo de la probabilidad ($p \geq 0.05$) si hay o no diferencia entre las medias.

Finalmente, con el valor obtenido de la probabilidad (p) se procede a calcular los valores máximos y mínimos (límites de detección y cuantificación) que son los rangos entre los cuales deben encontrarse los valores que se obtengan de la siembra por duplicado para el Control de Calidad Interno (CCI) aplicando las siguientes fórmulas:

$$L_{R1} = 1,96 * S_1 \quad L_{R2} = 1,96 * S_2$$

$$L_{r1} = 1,96 * S_1 \quad L_{r2} = 1,96 * S_2$$

Donde:
R= reproducibilidad
r= repetibilidad

Para el Control de Calidad Interno se realizó la siembra por duplicado de un alimento escogido al azar de cada diez que se muestreen hasta obtener un mínimo de treinta valores que servirán para graficar en las cartas de control y evaluar si el procedimiento se realiza de manera correcta.

Por otra parte se realizará el cálculo de la incertidumbre para obtener los límites de las cartas de control teniendo en cuenta las fuentes y/o componentes que se encuentran medidos en condiciones definidas o diferentes como indica el diagrama de causa-efecto.

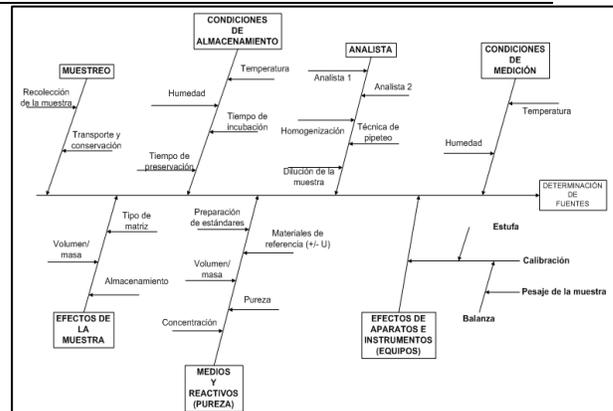


Figura 1. Diagrama causa-efecto de fuentes/componentes para determinar la incertidumbre

En el cálculo de la incertidumbre expandida, primeramente se utiliza el valor de incertidumbre de la balanza y estufa que el personal de metrología obtiene al momento de calibrar los equipos.

Para repetibilidad se utiliza el menor valor entre las desviaciones estándar obtenidas de los tres ajíes y en el nivel alto se saca la raíz cuadrada igualmente de las desviaciones estándar.

Otro valor a tomar en cuenta es la raíz cuadrada del valor de la desviación estándar al momento de realizar la exactitud por recuperabilidad.

Finalmente, la incertidumbre expandida (U) para aerobios mesófilos y coliformes totales en los niveles medio y alto es la raíz cuadrada de la sumatoria de todos los cuadrados de los valores obtenidos anteriormente multiplicados por el factor de cobertura que es constante ($k=2$), para un 95% de intervalo de confianza, y así se establece el intervalo superior e inferior dentro de los cuales los valores obtenidos en las siembras por duplicado se deben encontrar.

Para establecer los criterios de aceptación entre los cuales deben estar los valores obtenidos en el estudio, se calcula el porcentaje de incertidumbre expandida con el valor de U dividido en cada nivel por el valor más alto obtenido en la concentración de bacterias y todo eso dividido para cien, dicho resultado se debe encontrar 30% y así se aprueban los criterios.

DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE AEROBIOS MESÓFILOS Y COLIFORMES TOTALES MEDIANTE LA VERIFICACIÓN PREVIA DE LOS MÉTODOS AOAC 990.12 Y 991.14, RESPECTIVAMENTE, EN ALIMENTOS PREPARADOS. QUITO–ECUADOR, 2012-2013

Con los límites de cuantificación y detección y el rango obtenido con el cálculo de la incertidumbre se grafica las cartas de control, que son los valores sembrados por duplicado graficados en los intervalos, e indica si los resultados se encuentran dentro del rango permitido para conocer los posibles errores en el método y corregirlos.

Para determinar la exactitud recuperabilidad se utiliza cualquier ají y la cepa de bacterias ATCC 25922 de *E. coli*, ya que poseen una cantidad conocida de bacterias.

Primero lo siembra el ají solo y después la mezcla el ají con la cepa cuantificada ATCC en dos diluciones cada una, para determinar la recuperabilidad de la muestra se resta el valor obtenido de la mezcla (ají + ATCC) del valor del ají solo y el resultado debe indicar que se recuperó el 100% de bacterias *E. coli*.

La linealidad se obtiene al sembrar consecutivamente una muestra indistinta de ají en cinco diluciones diferentes.

Para todos los análisis y estudios estadísticos se calcula el logaritmo natural de los resultados para obtener valores pequeños y se observe de mejor las gráficas.

RESULTADOS

En el nivel bajo tanto para Aerobio mesófilos como para coliformes totales y *E. coli* no existió crecimiento bacteriano por lo que no fue necesario realizar un análisis estadístico.



Figura 2. Análisis microbiológico para evaluar reproducibilidad en bacterias aerobio mesófilos en el nivel bajo para: A) ají criollo, B) ají manaba, C) ají crudo. Quito – Pichincha 2012.

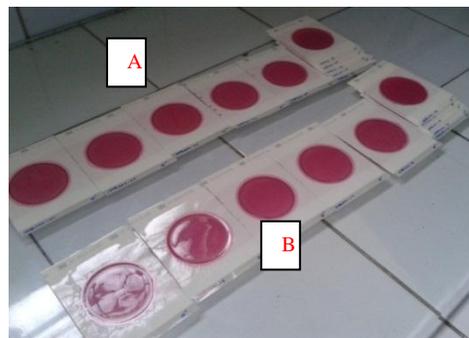


Figura 3. Análisis microbiológico en bacterias Coliformes totales y *E. coli* para ají manaba en el nivel bajo para evaluar: A) reproducibilidad, B) repetibilidad. Quito – Pichincha 2012

En el análisis estadístico el figura 4. mediante el diagrama de puntos indica visualmente que existe una diferencia significativa entre las medias de los dos analistas en cada uno de los ajíes al momento de evaluar la reproducibilidad en aerobio mesófilos para el nivel medio en el ensayo. El anexo 5 indica los resultados obtenidos en los diferentes niveles de concentración restantes.

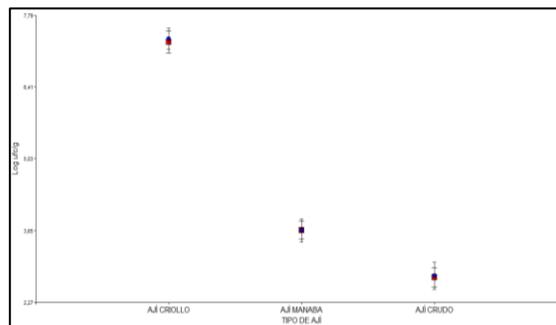


Figura 4. Diagrama de puntos para evaluar reproducibilidad en el nivel medio para aerobios mesófilos.

Mediante el análisis de varianza (ANOVA), en la tabla 2. para el estudio de reproducibilidad de aerobio mesófilos en el nivel medio se obtuvo valores que corroboran, mediante las pruebas de Tukey y Duncan (color rosado), que el valor de las medias entre los dos analistas no son significativamente diferentes.

De igual manera la tabla 2. indica que el valor de las medias entre el ají criollo, manaba y crudo son diferentes (color celeste) y para verificar estos valores por medio de la prueba de Fisher se obtuvo que el valores de $p \geq 0.05$

DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE AEROBIOS MESÓFILOS Y COLIFORMES TOTALES MEDIANTE LA VERIFICACIÓN PREVIA DE LOS MÉTODOS AOAC 990.12 Y 991.14, RESPECTIVAMENTE, EN ALIMENTOS PREPARADOS. QUITO–ECUADOR, 2012-2013

(color morado), que muestran estadísticamente que los tres ajíes son diferentes.

En base a las fórmulas planteadas en el análisis de datos de materiales y métodos en conjunto con los valores obtenidos de las medidas de resumen de la tabla 3. (color verde) se obtuvo los límites de detección superior e inferior como se observa en la tabla 4. que son de utilidad para determinar el rango máximo y mínimo entre los que deben estar los valores del control interno de calidad (CCI).

El anexo 5 y 7 muestran los resultados obtenidos para el estudio de aerobio mesófilos, coliformes totales y *E. coli* en los niveles de concentración medio y alto restantes.

Tabla 4. Límites de reproducibilidad para aerobio mesófilos, coliformes totales.

LÍMITES DE REPRODUCIBILIDAD					
Para aerobio mesófilos nivel medio			Para aerobio mesófilos nivel alto		
L_{R1}	0,43		L_{R1}	0,56	
Límite inferior	0		Límite inferior	0	
Límite superior	0,43		Límite superior	0,56	
Para coliformes totales nivel medio			Para coliformes totales nivel alto		
L_{R1}	0,62		L_{R1}	0,35	
			L_{R2}	0,11	
Límite inferior	0		Límite inferior	0	
Límite superior	0,62		Límite superior	0,35	

En el diagrama de puntos del figura 5 indica visualmente que existe una diferencia significativa entre las medias de cada uno de los ajíes al momento de evaluar la repetibilidad en aerobio mesófilos para el nivel medio en el ensayo. El anexo 6 indica los resultados obtenidos en los diferentes niveles de concentración restantes.

Tabla 2. Tabla de análisis de varianza para evaluar reproducibilidad en aerobio mesófilos en el nivel medio.

ANÁLISIS DE VARIANZA										
Error		2,39	56	0,04	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Total		233,58	59		Log ufo/g	60	0,99	0,99	4,52	
Test: Tukey		Alfa= 0,05	DMS= 0,15755		Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)					
Error:	0,0427	gl:	56		F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Tipo de ají	Medias	n	E.E	Letra	Modelo	231,19	3	77,06	1802,93	<0,0001
Ají CRUDO	2,77	20	0,05	A	Tipo de ají	231,18	2	115,59	2704,26	<0,0001
Ají MANABA	3,66	20	0,05	B	analista	0,01	1	0,01	0,26	0,6094
Ají CRIOLLO	7,3	20	0,05	C	Error	2,39	56	0,04		
Test: Tukey		Alfa= 0,05	DMS= 0,10701		Total	233,58	59			
Error:	0,0427	gl:	56		Test: Duncan			Alfa= 0,05		
Analista	Medias	n	E.E	Letra	Error:	0,0427	gl:	56		
1	4,56	30	0,04	A	Tipo de ají	Medias	n	E.E	Letra	
2	4,59	30	0,04	A	Ají CRUDO	2,77	20	0,05	A	
					Ají MANABA	3,66	20	0,05	B	
					Ají CRIOLLO	7,3	20	0,05	C	
					Test: Duncan			Alfa= 0,05	DMS= 0,10701	
					Error:	0,0427	gl:	56		
					Analista	Medias	n	E.E	Letra	
					1	4,56	30	0,04	A	
					2	4,59	30	0,04	A	
Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<0,05)										
Prueba de F para igualdad de varianzas										
Variable	Grupo (1)	Grupo (2)	n(1)	n(2)	Var(1)	Var(2)	F	p	prueba	
Log ufo/g	Ají Criollo	Ají Crudo	20	20	0,04	0,05	0,87	0,7624	Bilateral	
Log ufo/g	Ají Criollo	Ají Manaba	20	20	0,04	0,04	1,17	0,7416	Bilateral	
Log ufo/g	Ají Crudo	Ají Manaba	20	20	0,05	0,04	1,34	0,5279	Bilateral	

Tabla 3. Tabla de análisis de varianza para evaluar reproducibilidad en aerobio mesófilos en el nivel medio.

Medidas de resumen						
Tipo de ají	Variable	n	Media	D.E.	Min	Máx
Ají Criollo	Log ufo/g	20	7,3	0,21	7,06	7,56
Ají Crudo	Log ufo/g	20	2,77	0,22	2,48	3,11
Ají Manaba	Log ufo/g	20	3,66	0,19	3,40	4,15

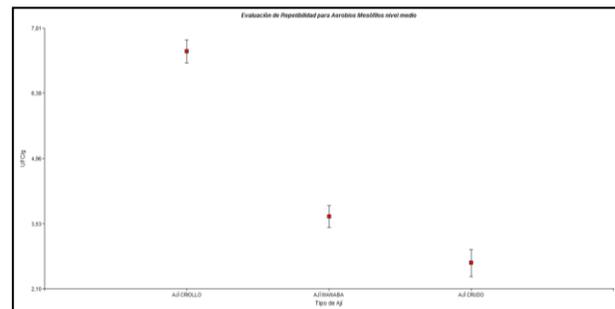


Figura 5. Diagrama de puntos para evaluar repetibilidad en el nivel medio para aerobio mesófilos.

Al momento de evaluar la repetibilidad, la tabla 5 indica que el valor de las medias entre el ají criollo, manaba y crudo son diferentes gracias a la prueba de Fisher, porque se obtuvo valores de $p \geq 0.05$ (color azul) que muestran estadísticamente que los tres ajíes son diferentes.

En base a las fórmulas planteadas en el análisis de datos de materiales y métodos en conjunto con los valores obtenidos de las medidas de resumen de la tabla 5 (color verde) se obtuvo los límites de detección superior e inferior como se observa en la tabla 6. que son de utilidad para determinar el rango máximo y mínimo entre los que deben estar los valores del control interno de calidad (CCI).

El anexo 6 y 8 muestran los resultados obtenidos para el estudio de aerobio mesófilos, coliformes totales y *E. coli* en los

DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE AEROBIOS MESÓFILOS Y COLIFORMES TOTALES MEDIANTE LA VERIFICACIÓN PREVIA DE LOS MÉTODOS AOAC 990.12 Y 991.14, RESPECTIVAMENTE, EN ALIMENTOS PREPARADOS. QUITO–ECUADOR, 2012-2013

niveles de concentración medio y alto restantes.

Tabla 5. Tabla de igualdad de varianzas y medidas de resumen para evaluar repetibilidad en aerobio mesófilos nivel medio.

Prueba de F para igualdad de varianzas									
Variable	Grupo (1)	Grupo (2)	n(1)	n(2)	Var(1)	Var(2)	F	p	p
Log ufc/g	Aji Criollo	Aji Crudo	20	20	0,06	0,09	0,69	0,4228	Bi
Log ufc/g	Aji Criollo	Aji Manaba	20	20	0,06	0,06	1,11	0,8211	Bi
Log ufc/g	Aji Crudo	Aji Manaba	20	20	0,09	0,06	1,61	0,3052	Bi

Medidas de resumen						
Tipo de aji	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
Aji Criollo	Log ufc/g	20	7,3	0,25	7,00	7,64
Aji Crudo	Log ufc/g	20	2,67	0,30	2,00	3,11
Aji Manaba	Log ufc/g	20	3,68	0,24	3,30	4,04

Tabla 6. Límites de repetibilidad para aerobio mesófilos, coliformes totales y E. coli

LÍMITES DE REPETIBILIDAD		
Para aerobio mesófilos nivel medio		
L_{r1}	0,58	
Límite inferior	0	
Límite superior	0,58	
Para coliformes totales nivel medio		
L_{r1}	0,58	
Límite inferior	0	
Límite superior	0,58	
Para E.coli nivel medio		
L_{r1}	1,56	
Límite inferior	0	
Límite superior	1,56	

LÍMITES DE REPETIBILIDAD		
Para aerobio mesófilos nivel alto		
L_{r1}	0,62	
L_{r2}	0,25	
Límite inferior	0	
Límite superior	0,62	
Para coliformes totales nivel alto		
L_{r1}	3,56	
L_{r2}	1,79	
Límite inferior	0	
Límite superior	3,56	

Las siembras por duplicado para el control de calidad interno nos dieron como resultado los valores del anexo 9.

Por otra parte, con la incertidumbre expandida calculada se obtuvieron valores para los límites superior e inferior entre los cuales deben encontrarse los valores obtenidos en las siembras por duplicado del anexo 9, como se observa en la tabla 7.

Tabla 7. Tabla del cálculo de incertidumbre expandida.

FUENTE	VALOR U	UNIDADES			
BALANZA	0,018	gramos			
ESTUFA	0	5s			
REPETIBILIDAD					
AM	NIVEL MEDIO	0,23	log UFC/g	CT	
	NIVEL ALTO	0,31822768	log UFC/g		NIVEL MEDIO
					NIVEL ALTO
					0,14142136
REPRODUCIBILIDAD					
AM	NIVEL MEDIO	0,223606798	log UFC/g	CT	NIVEL MEDIO
	ALTO	0,282842712	log UFC/g		NIVEL ALTO
	EXACTITUD	0,741619848			0,28284271
		0,23			log UFC/g
NIVEL ALTO		NIVEL MEDIO			NIVEL ALTO
INCERTIDUMBRE "u"					INCERTIDUMBRE "u"
0,854550174		0,39603924			0,80038462
INCERTIDUMBRE EXPANDIDA "U"					INCERTIDUMBRE EXPANDIDA "U"
1,709100348		0,79007848			1,61276905
PORCENTAJE DE U					PORCENTAJE DE U
28,4850058		21,5488857			
LÍMITES AM NIVEL ALTO					36,653842
4,29899662	INFERIOR	5,20982162			LÍMITE CT NIVEL ALTO
7,709100348	SUPERIOR	6,79507848			5,01276905
					SUPERIOR
					2,78723085
					INFERIOR

Con los resultados obtenidos en la tabla 4 y 6 junto con los valores del anexo 9 se obtuvieron las diferentes cartas de control. La figura 6 nos indica que la muestra 37 se encuentra fuera del límite superior y que la variabilidad de picos evidencia las diferentes concentraciones de bacterias aerobio mesófilos que existe en diversos alimentos según haya sido su preparación y/o manipulación y, pone en alerta al analista para realizar una nueva siembra y comprobar que el procedimiento se hace de manera correcta.

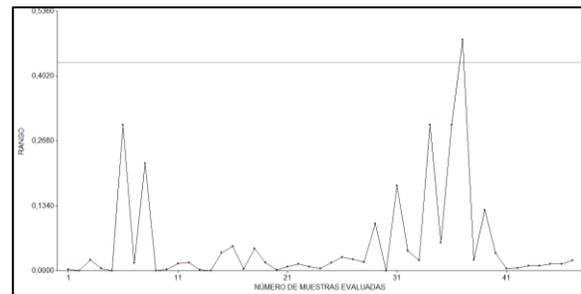


Figura 6. Carta de control evaluada para reproducibilidad en el nivel medio para aerobios mesófilos.

El anexo 10 indica los resultados de las cartas de control restantes evaluadas para repetibilidad y reproducibilidad para aerobio mesófilos, coliformes totales y E. coli e indican que el procedimiento se aplica de manera correcta con algunos llamados de atención posiblemente en la homogenización o por la cantidad elevada de bacterias en los alimentos.

Con los resultados obtenidos en la tabla 7 y los valores del anexo 9 permitieron obtener las diferentes cartas de control con el cálculo de la incertidumbre. El figura 7 indica que todos los valores se encuentran fuera de los límites superior e inferior lo que evidencia que el error se encuentra en la calibración de los equipos y/o en el analista al momento de homogenizar la muestra para la siembra y/o en la técnica de pipeteo.

DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE AEROBIOS MESÓFILOS Y COLIFORMES TOTALES MEDIANTE LA VERIFICACIÓN PREVIA DE LOS MÉTODOS AOAC 990.12 Y 991.14, RESPECTIVAMENTE, EN ALIMENTOS PREPARADOS. QUITO–ECUADOR, 2012-2013

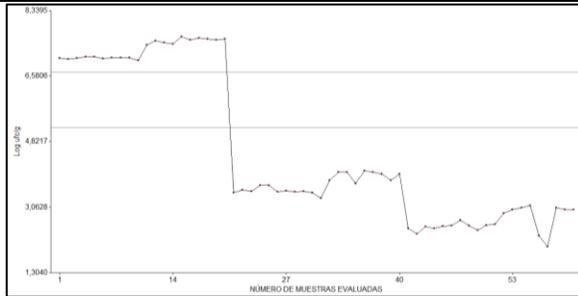


Figura 7. Carta de control evaluada para repetibilidad en el nivel medio para aerobio mesófilos por medio de incertidumbre.

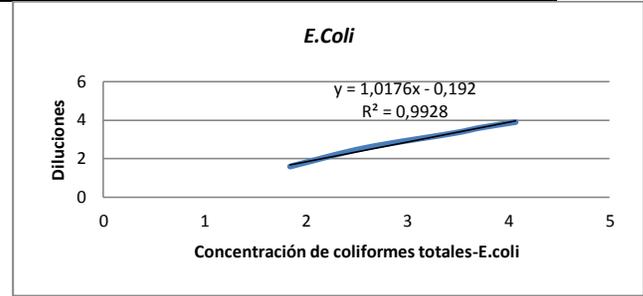


Figura 8. Cálculo de linealidad

El anexo 11 indica los resultados de las cartas de control restantes evaluadas para repetibilidad y reproducibilidad para aerobio mesófilos, coliformes totales y *E. coli* e indican que aunque el procedimiento se aplica de manera correcta el error se debe a factores externos y no enfocados al analista existiendo algunos llamados de atención posiblemente en la homogenización o por la cantidad elevada de bacterias presente en los alimentos.

La tabla 8 indica que se logró recuperar el 100% de bacterias presentes en la muestra.

Tabla 8. Tabla de exactitud por recuperabilidad.

EXACTITUD POR RECUPERABILIDAD (<i>E. Coli</i>)							
AJÍ NORMAL		AJÍ-ATCC		ATCC		RECUPERABILIDAD	
DILUCION	DILUCION	DILUCION	DILUCION	DILUCION	DILUCION	DILUCION	DILUCION
10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁴
600	40	3600	530	3000	490	3000	490
2,77815125	1,60205999	3,5563025	2,72427587	3,47712125	2,69019608	3,47712125	2,69019608

Se obtuvo mediante la siembra consecutiva de diluciones que van de 1 a 5 la linealidad presente en la muestra como se observa en la tabla 9 y en la figura 8.

Tabla 9. Tabla de linealidad

LINEALIDAD (ATCC + AJÍ)					
MUESTRA	DILUCION	RESULTADO	LOG		
		COLIFORMES TOTALES	<i>E. Coli</i>	COLIFORMES TOTALES	<i>E. Coli</i>
1	-1	11800	8000	4,07188201	3,903085
2	-2	5200	4000	3,71600334	3,602055
3	-3	3000	2200	3,47712125	3,342422
4	-4	380	360	2,5797836	2,556302
5	-5	70	40	1,84509804	1,602055

DISCUSIÓN

Los microorganismos tienen la capacidad de multiplicarse en cualquier ambiente y de manera acelerada con las condiciones adecuadas; para contrarrestar el crecimiento apresurado de bacterias las instituciones que preparan gran variedad de productos alimenticios se ven obligados a mantener estándares de calidad con ayuda de análisis microbiológicos de cada uno de los productos que ofrecen al consumidor. Por esta razón, el laboratorio CEA determinó la carga bacteriana de aerobios mesófilos y coliformes totales, en tres establecimientos que solicitaron un estudio de la calidad de sus productos, que conllevó la previa verificación de los métodos AOAC 990.12 y 991.14 respectivamente, seleccionando como alimento preparado al ají para obtener resultados clínicamente útiles en cada investigación.

Se seleccionó el ají como matriz por ser considerado crítico ya que antes de llegar a manos del usuario pasa por un proceso que involucra varios aspectos; entre ellos: la manipulación higiénica de los mismos, desde su producción, distribución, almacenamiento y consumo, etapas en las cuales están involucrados los productores primarios que manipulan el alimento para transportarlo y lo transforman hasta llegar al consumidor. Así mismo, se la considera crítica por ser un reservorio de bacterias una vez que ha sido preparado, por ejemplo, al momento de ser manipulado puede contaminarse con otros alimentos, superficies, recipientes y utensilios que no fueron desinfectados previamente, es decir se contaminan de manera primaria, directa y/o cruzada, siendo las causas principales de enfermedades comunes que son de origen alimentario [7].

DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE AEROBIOS MESÓFILOS Y COLIFORMES TOTALES MEDIANTE LA VERIFICACIÓN PREVIA DE LOS MÉTODOS AOAC 990.12 Y 991.14, RESPECTIVAMENTE, EN ALIMENTOS PREPARADOS. QUITO-ECUADOR, 2012-2013

Según la guía de inocuidad alimentaria en su estudio de producción y distribución de aguacate muestra que el agua es un factor determinante en la presencia de bacterias patógenas de *E. coli*. Gracias a la investigación realizada, al momento de seleccionar el ají como matriz se tomó en cuenta la presencia del agua, por ser un elemento en constante contacto con los ingredientes utilizados para su preparación, en las manos de quien lo realiza y en las superficies donde se elabora, como causa de la presencia de bacterias encontradas en el análisis de los alimentos [30].

Los productos y servicios llegan a ser de calidad cuando al momento de ser analizados permiten la mejora continua de la empresa que los ofrece. Gracias a estos antecedentes el laboratorio CEA realizó la verificación de sus métodos con el fin de garantizar al cliente que el producto que consumen es de buena calidad y que cumple con los parámetros normados por la ley ecuatoriana en función de los parámetros que demanda la norma INEN – ISO 17025:2005 [11].

Existen varios métodos para detectar bacterias en alimentos, aquellos que determinan no solo el recuento de microorganismos viables totales (aerobios mesófilos) sino también los que producen enfermedades.

La técnica que el laboratorio CEA emplea en cada análisis demanda mucho tiempo pero dan resultados exactos y confiables porque es el ser humano quien confirma lo hecho y emite el resultado y no un equipo electrónico que genera una probabilidad de haber encontrado lo solicitado; por el contrario se está implementando tecnología diferente para investigar las muestras en menor tiempo y con una sensibilidad alta, por ello la doctora María Antonia Ferrús de la Universidad Politécnica de Valencia da a conocer que los métodos utilizados en el pasado detectan ciertos microorganismos mientras que otros pasan aún desapercibidos, lo que afirma es que gracias a la implementación de métodos moleculares en el diagnóstico se puede identificar directamente la secuencia específica de DNA de la bacteria patógena generando controversia porque el equipo debe tener una

sensibilidad demasiado alta caso contrario la técnica no será de mucha utilidad [32].

Para verificar si la metodología empleada en el laboratorio CEA se realiza correctamente se analizó ají de chocho en base a los métodos AOAC y BAM e INEN que se utilizan en los laboratorios LABOLAB y LASA respectivamente.

En base al anexo 13 se puede observar que los métodos INEN Y AOAC evidencian que existe presencia de bacterias pero se debe considerar que el valor numérico obtenido puede no reflejar el número real de microorganismos vitales (viables) en la muestra, porque las células microbianas suelen agruparse formando cadenas, grumos, racimos o pares y no separarse a pesar de la homogeneización y dilución de la muestra, por tanto, una colonia puede provenir de una célula individual o de un agrupamiento bacteriano; de igual manera si han sufrido alguna lesión o no tienen las condiciones adecuadas de crecimiento no podrán multiplicarse [15].

Por otro lado, el método BAM utilizado en LABOLAB no solamente es un estudio de recuento en placa sino de siembra en profundidad lo que permite verificar la efectividad del método y determinar el origen de la contaminación durante los procesos de elaboración de los alimentos, dando a conocer resultados verdaderos de la presencia de bacterias [16].

Cada una de las metodologías utilizadas son buenas en algunos casos pero deficientes en otros debido al número de colonias encontradas en un tiempo de incubación determinado porque por pruebas confirmatorias q se realiza en los métodos AOAC e INEN se obtiene un resultado verídico en 72 horas para coliformes totales y *E. coli* siendo una desventaja, lo que no sucede con el método BAM.

El anexo 13 indica que para recuento de aerobio mesófilos el método BAM es el más específico debido a la cantidad de colonias encontradas con precisión y exactitud.

Para coliformes totales el rango tiene mayor amplitud para el método AOAC permitiendo

DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE AEROBIOS MESÓFILOS Y COLIFORMES TOTALES MEDIANTE LA VERIFICACIÓN PREVIA DE LOS MÉTODOS AOAC 990.12 Y 991.14, RESPECTIVAMENTE, EN ALIMENTOS PREPARADOS. QUITO–ECUADOR, 2012-2013

encontrar hasta 10^3 colonias mientras que para BAM e INEN solamente es hasta 10^2 , pudiendo ser una desventaja si existiesen más bacterias ya que se deben realizar más diluciones hasta encontrar la cantidad de microorganismos dentro de parámetros.

Para *E. coli* en los tres métodos se establece que el número máximo de colonias presentes en un alimento debe ser de 10, porque es causante de una gran variedad de enfermedades gastrointestinales que si no se tratan a tiempo causan la muerte o un daño severo en el organismo humano.

Por último, sin importar el método a emplear el llevar un control de calidad interno en el laboratorio se considera importante porque permite conocer si el procedimiento que usa el establecimiento y la capacitación que reciben los analistas es adecuada para garantizar los resultados [33].

CONCLUSIONES

Se determinó gracias a la metodología aplicada, al momento de realizar el conteo bacteriano, que los alimentos por distintos que sean evidencia que existe carga bacteriana tolerable debido a una manipulación obligada para su generación.

Se consideran alimentos críticos, aquellos que sufren de una manipulación considerable, que no van a ser sometidos a acción térmica previo a su consumo, igualmente aquellos en los que se requieren varios componentes crudos. Ejemplo: ají, ensaladas crudas, jugos.

Con los porcentajes de incertidumbre obtenidos se confirmó que los métodos AOAC 990.12 y 991.14 se aplicaron de forma apropiada en el laboratorio CEA.

Las fuentes principales de contaminación son la manipulación inadecuada de la materia prima, el lavado inadecuado del material (frutas y legumbres) para su bodegaje y posterior uso, la falta de desinfección apropiada en los utensilios utilizados, la mala higiene del personal, por contaminación cruzada con otros productos y el agua. Los resultados obtenidos en los inter laboratorios no se pueden comparar por que

la metodología empleada en cada uno de ellos es diferente.

En los análisis inter laboratorios se muestra que los resultados obtenidos están dentro de parámetros en cada una las metodologías aplicadas.

RECOMENDACIONES

Seguir e implementar la guía de buenas prácticas que se encuentra en el anexo 14 en base a referencias bibliográficas.

La calidad del agua debe ser purificada o mínimo potable no solo para la preparación de los alimentos sino para todo el proceso – materia prima, preparación – lavado de manos, utensilios, etc.

Realizar rutinariamente análisis de agua, superficies vivas y muertas.

Realizar control microbiológico periódico y al azar al personal durante el trabajo, después del trabajo o antes de que inicie para controlar la carga bacteriana.

Tomar al azar de manera periódica diferentes utensilios para realizar el estudio microbiológico (vasos, cubiertos, diferentes platos).

Toda la materia prima debe ser lavada y pasada por desinfectante por dos ocasiones antes de ser procesada, los alimentos más lo requieren son: frutas (mora, frutilla), perejil, culantro, cebollas, cebollines, por sus superficies irregulares.

Los alimentos que no son sometidos a acción térmica (cocción – horneado), deben ser controlados microbiológicamente con mucha regularidad.

Es importante que exista luz solar en las cocinas, porque permite el ingreso de luz UV importante para eliminar la presencia de mohos y levaduras cuyos tóxicos pueden causar intoxicación alimentaria.

No utilizar derivados de productos yodados para desinfectar, solo puede ser usado como sanitizante y no tiene mucha acción sobre mohos y levaduras.

DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE AEROBIOS MESÓFILOS Y COLIFORMES TOTALES MEDIANTE LA VERIFICACIÓN PREVIA DE LOS MÉTODOS AOAC 990.12 Y 991.14, RESPECTIVAMENTE, EN ALIMENTOS PREPARADOS. QUITO–ECUADOR, 2012-2013

No utilizar de manera indefinida el mismo desinfectante o sanitizante, porque en cada reproducción bacteriana el 10% genera resistencia.

de 2012, de
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/w8088s/w8088s01.pdf>

BIBLIOGRAFÍA

1. Métodos Analíticos. (2012). *Selección y Validación de Métodos Analíticos*. Recuperado el 2012 de febrero de 2012, de http://www.euskadi.net/r33-2709/es/contenidos/informacion/sanidad_alimentaria/es_1247/adjuntos/vigila9519.pdf
2. Abu, S. (2008). *Los microorganismos que contaminan los alimentos*. Recuperado el 14 de febrero de 2012, de <http://radio.rpp.com.pe/saludenrpp/los-microorganismos-que-contaminan-los-alimentos/>
3. Anderson, P., & Pascual, V. (2000). *Metodología analítica para alimentos y bebidas*. madrid.
4. ANMAT, A. N. (2008). *Recomendaciones para la correcta manipulación de alimentos en locales que elaboran y venden comidas preparadas*. Recuperado el 15 de febrero de 2012, de http://www.anmat.gov.ar/cuida_tus_alimentos/locales.pdf
5. Calaña, G., & Chais, E. (2009). *Gestión de la calidad e inocuidad alimentaria en restauración*. Recuperado el 13 de febrero de 2012
6. Castón, M. (2010). *Higiene, inspección y control alimentario*. Recuperado el 14 de febrero de 2012, de <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/higiene-inspeccion-y-control-alimentario/practicas-1/tema-1.pdf>
7. Chávez, H. (2006). *Manipulación higiénica de los alimentos*. Recuperado el 29 de mayo de 2013
8. Eurachem. (1998). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*. Recuperado el 2012 de agosto de 2012, de <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>
9. Food And Agriculture Organization Of The Unites Nations. (2000). *Código Internacional Recomendado de Prácticas – Principios Generales de Higiene de Alimentos*. Recuperado el 13 de febrero de 2012, de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/w8088s/w8088s01.pdf>
10. Food And Agriculture Organization Of The Unites Nations. (2006). *Perfil de proyecto calidad e inocuidad de alimentos*. Recuperado el 14 de febrero de 2012, de <http://www.qcaquality.com.ar/sistema-de-seguridad-de-los-alimentos-haccp-y-gmp.html>
11. Gobierno de Chile "SAG". (2000). *Instructivo para recuento de microorganismos aerobios mesófilos mediante técnica petrifilm AOAC 990.12*. Recuperado el 16 de febrero de 2012, de <http://historico.sag.gob.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCryptedData=GP1TtXdhRJAS2Wp3v88hB17Pf6lazkmq89cmzNMQGw%3D&argModo=&argOrigen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivold=23275>
12. Hirata, M. (2009). *Por qué validar métodos analíticos?* Recuperado el 18 de febrero de 2012, de <http://es.scribd.com/doc/4925527/porque-validar-metodos-analiticos>
13. ICCA, I. I. (2008). *Buenas prácticas agrícolas*. Recuperado el 18 de febrero de 2012, de http://www.iica.int/Esp/Programas/agronegocios/Publicaciones%20de%20Comercio%20Agronegocios%20e%20Inocuidad/Cuaderno11_BPA.pdf
14. INEN, I. E. (2006). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos*. Recuperado el 5 de agosto de 2013, de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.5.2006.pdf>
15. ISPCH, I. d. (2012). *Procedimiento recuento aerobios en placa método BAM online 2001*. Recuperado el 7 de agosto de 2013, de http://www.ispch.cl/lab_amb/doc/microbiologia_alimentos/PRT-023.pdf
16. Ivo. (2000). *Seguridad e higiene en la cocina, Turismo. Equipo y maquinaria. Superficies del piso. Instrumentos de trabajo. Ventilación. Apariencia personal. Seguridad. Electrodomésticos. Gas, Argentina*. Recuperado el 29 de mayo de 2013, de <http://html.rincondelvago.com/seguridad-e-higiene-en-la-cocina.html>

DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE AEROBIOS MESÓFILOS Y COLIFORMES TOTALES MEDIANTE LA VERIFICACIÓN PREVIA DE LOS MÉTODOS AOAC 990.12 Y 991.14, RESPECTIVAMENTE, EN ALIMENTOS PREPARADOS. QUITO–ECUADOR, 2012-2013

17. León, J. (2006). *Validación secundaria del método de número más probable y recuento en placa profunda para coliformes totales y fecales en muestras de alimentos basada en la norma ISO NRC 17025*. Recuperado el 18 de febrero de 2012, de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis273.pdf>
18. L&S Consultores. (2003). *Validación de métodos de ensayo*. Recuperado el 18 de febrero de 2012, de <http://www.lysconsultores.com/Descargar/NT004.pdf>
19. Manual De Higiene Alimentaria. (2012). *Certificado de manipulación, comidas preparadas*. Recuperado el 14 de febrero de 2012, de <http://www.gamsa.es/material/docs/2.pdf>
20. Ministerio de Salud Pública de Chile. (2000). *Inocuidad Alimentaria*. Recuperado el 13 de febrero de 2012, de <http://www.ispch.cl/inocuidad-alimentaria>
21. Organización Mundial De La Salud. (2009). *10 Datos sobre la inocuidad de los alimentos*. Recuperado el 13 de febrero de 2012 de http://www.who.int/features/factfiles/food_safety/es/index.html
22. Organismo Mundial de la Salud "OMS" (2007). *Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos*. Recuperado el 29 de mayo de 2013, de http://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/manual_keys_es.pdf
23. Pascual, A. (2005). *Enfermedades de tipo alimentario*. . Recuperado el 14 de febrero de 2012, de http://libritosgt.blogspot.com/2011/10/enfermedades-de-origen-alimentario-su_03.html
24. Pérez, S. (2013). *Relación peso-diluyente de la muestra*. Recuperado el 5 de agosto de 2013
25. Quality Consulting Associates "QCA". (2012). *Sistema de seguridad de los alimentos HACCP y GMP*. Recuperado el 14 de febrero de 2012, de <http://www.qcaquality.com.ar/sistema-de-seguridad-de-los-alimentos-haccp-y-gmp.html>
26. Piédrola, G. (2000). *Medicina preventiva y salud pública*. España: MASSON.
27. Rugama, F., & Castillo, Y. (2010). *Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria*. Recuperado el 14 de febrero de 2012, de <http://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf>
28. Salazar, H., & González, R. (1999). *Guía de inocuidad alimentaria y sus implicaciones para la producción y distribución del aguacate "HASS" mexicano*. Recuperado el 15 de junio de 2013
29. Universidad de Zaragoza. (2011). *Validación de técnicas analíticas aplicadas al control de calidad y seguridad alimentaria*. Recuperado el 18 de febrero de 2012, de <http://titulaciones.unizar.es/admin/lectorPDFasig.php?cod=62017&year>
30. UPV. (2009). *Proponen nuevos métodos para detectar bacterias en alimentos*. . Recuperado el 19 de junio de 2013, de <http://www.agenciasinc.es/Noticias/Proponen-nuevos-metodos-para-detectar-bacterias-en-alimentos>
31. Valenzuela, L. (2010). *Herramientas estadísticas para control de calidad*. Recuperado el 29 de mayo de 2013, de http://www.acreditacionensalud.cl/media/users/14/748893/files/222147/Clase_4.pdf
32. Varela, E., & Martínez, J. (2006). *Seguridad, Calidad e Inocuidad Alimentaria para México*. Recuperado el 13 de febrero de 2012, de <http://www.turevista.uat.edu.mx/INOCUIDAD.htm>