

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y  
BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA  
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE  
DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD



**VERIFICACIÓN DEL DESEMPEÑO DE PLACAS  
3M™ PETRIFILM™ EN RELACIÓN A LA NB:32014 Y  
NB:32005 PARA EL RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS  
Y *ESCHERICHIA COLI*, EN QUESO Y FRUTILLA  
FRESCA**

Trabajo de Grado presentado para la obtención de la Especialidad en Diagnóstico de Laboratorio  
en Microbiología, Mención Microbiología de Alimentos

**POR: LIC. HELEN ROCIO MACHACA LUCANA**

**TUTORA: M.SC. ANGÉLICA MARÍA ESPADA SILVA**

LA PAZ – BOLIVIA

Noviembre, 2023

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo a Dios, a mis padres, mis hermanos y al personal del Instituto SELADIS (Docentes, Consultores, Administrativos, Residentes e Internos) quienes, ante las dificultades diarias, me brindaron consejos sabios, motivación y apoyo incondicional durante la residencia y la elaboración de mi Trabajo de Grado.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Mayor de San Andrés, la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas y al Instituto “SELADIS”, por su institucionalidad y excelente formación profesional en el área de la salud.

A mi asesora: M.Sc. Angélica María Espada Silva, por haberme orientado en la elaboración de este Trabajo de Grado con su conocimiento y amplia experiencia profesional.

A mis tribunales por sus contribuciones para mejorar la presentación de este Trabajo de Grado.

A todas las personas que de manera indirecta ayudaron en la presentación de este Trabajo de Grado.

## CONTENIDO

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Inocuidad alimentaria .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Indicadores sanitarios .....</b>	<b>2</b>
<b>2.3</b>	<b>Grupos de riesgo .....</b>	<b>3</b>
<b>2.4</b>	<b><i>Enterobacteriaceae</i> .....</b>	<b>3</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Ecología.....</b>	<b>3</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Patogenia .....</b>	<b>4</b>
<b>2.5</b>	<b><i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Ecología.....</b>	<b>4</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Patogenia .....</b>	<b>4</b>
<b>2.6</b>	<b>Importancia del consumo de la frutilla .....</b>	<b>5</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Características de la frutilla como factor de riesgo sanitario.....</b>	<b>6</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Requisitos microbiológicos - Frutas y verduras.....</b>	<b>6</b>
<b>2.7</b>	<b>Importancia del consumo de queso fresco.....</b>	<b>7</b>
<b>2.7.1</b>	<b>Características del queso fresco como factor de riesgo sanitario.....</b>	<b>8</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Requisitos microbiológicos de los productos lácteos - Queso fresco .....</b>	<b>8</b>
<b>2.8</b>	<b>Métodos de análisis microbiológico de referencia .....</b>	<b>9</b>
<b>2.8.1</b>	<b>Recuento en placa para enterobacterias – NB 32014:2004.....</b>	<b>9</b>
<b>2.8.2</b>	<b>Recuento en placa para <i>Escherichia coli</i> – NB 32005:2002.....</b>	<b>10</b>
<b>2.9</b>	<b>Métodos de análisis microbiológico alternativos .....</b>	<b>10</b>
<b>2.9.1</b>	<b>Recuento de Enterobacterias - AOAC Official Method 2006.01 por placa Petrifilm™.....</b>	<b>10</b>
<b>2.9.2</b>	<b>Recuento de <i>Escherichia coli</i> – NB 32020:2005 por placa Petrifilm™.....</b>	<b>11</b>
<b>2.10</b>	<b>Consideraciones teóricas de las Normas Internacionales aplicadas al Laboratorio .....</b>	<b>12</b>

2.11	Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración - Norma NB/ISO/IEC 17025:2018 .....	12
2.12	Validación.....	13
2.12.1	Tipos de validación .....	13
2.12.2	Validación inicial o completa .....	13
2.12.3	Validación secundaria o verificación .....	13
2.12.4	Establecimiento de un plan de verificación .....	14
2.12.5	Elección del analista responsable de realizar las pruebas analíticas .....	14
2.12.6	Elección de matrices .....	14
2.12.7	Elección de categorías a utilizar .....	14
2.12.8	Elección de cepas.....	14
2.13	Parámetros analíticos para la verificación del desempeño de un método cuantativo según Norma ISO 16140-2:2016.....	15
2.14	Control de calidad del proceso de verificación .....	15
3.	ANTECEDENTES .....	16
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
5.	JUSTIFICACIÓN .....	19
6.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	20
7.	PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS .....	21
8.	OBJETIVOS .....	22
8.1	OBJETIVO GENERAL.....	22
8.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
9.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	23
9.1	Tipo o diseño del estudio.....	23
9.2	Sitio o contexto del estudio .....	23
9.3	Universo y población o muestra .....	23
9.3.1	Tamaño de muestra.....	24

9.3.2	Criterios de inclusión .....	24
9.3.3	Criterios de exclusión .....	25
9.4	Descripción de las técnicas y procedimientos mas importantes.....	25
9.4.1	Parámetros de evaluación del desempeño de los métodos de cultivo microbiológico.....	31
9.4.1.1	Determinación de la inclusividad, para el recuento de enterobacterias y <i>Escherichia coli</i> .....	31
9.4.1.2	Determinación de la exclusividad para el recuento de enterobacterias y <i>Escherichia coli</i> .....	31
9.4.1.3	Límite de cuantificación .....	32
9.4.1.4	Estudio de Veracidad Relativa .....	32
9.4.1.5	Estudio de Perfil de Precisión .....	34
9.4.1.6	Análisis de muestras de queso fresco y frutilla de mercados populares de la ciudad de La Paz.....	35
9.5	Análisis estadístico.....	35
10.	RESULTADOS.....	36
11.	DISCUSIÓN .....	51
12.	CONCLUSIONES.....	55
13.	RECOMENDACIONES.....	56
14.	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	57
15.	GLOSARIO .....	58
16.	BIBLIOGRAFÍA.....	62
17.	ANEXOS .....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Composición fisicoquímica y nutricional de la frutilla en 100 gramos.....	5
<b>Tabla 2</b> Norma Chilena – Parámetros microbiológicos para el control microbiológico de frutas y otros vegetales.....	7
<b>Tabla 3</b> Composición fisicoquímica y nutricional del queso fresco en 100 gramos.....	7
<b>Tabla 4</b> Norma Boliviana – Parámetros microbiológicos para el control microbiológico de queso fresco.....	8
<b>Tabla 5</b> Norma Chilena – Parámetros microbiológicos para el control microbiológico de queso fresco.....	9
<b>Tabla 1</b> Búsqueda de matriz libre del analito objeto de estudio.....	23
<b>Tabla 2</b> Búsqueda de matrices para la puesta en marcha de los métodos evaluados.....	24
<b>Tabla 3</b> Cepas ATCC utilizadas para el estudio.....	29
<b>Tabla 4</b> Cepas nativas utilizadas como interferentes.....	29
<b>Tabla 1</b> Recuperación de enterobacterias por los métodos de referencia y alternativo....	36
<b>Tabla 2</b> Recuperación de <i>Escherichia coli</i> por los métodos de referencia y alternativo....	37
<b>Tabla 3</b> Inhibición de bacterias diferentes a enterobacteriaceae.....	38
<b>Tabla 4</b> Inhibición de bacterias diferentes a <i>Escherichia coli</i> .....	39
<b>Tabla 5</b> Límite de Cuantificación para el recuento de enterobacterias y <i>Escherichia coli</i> por el método de referencia y alternativo.....	40
<b>Tabla 6</b> Recuento de enterobacterias y <i>Escherichia coli</i> , en 15 muestras de queso fresco, procedentes de 5 mercados populares de la ciudad de La Paz.....	49
<b>Tabla 7</b> Recuento de enterobacterias y <i>Escherichia coli</i> , en 15 muestras de frutilla, procedentes de 5 mercados populares de la ciudad de La Paz.....	50

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Tabla 1</b> Composición fisicoquímica y nutricional de la frutilla en 100 gramos.....	5
<b>Tabla 2</b> Norma Chilena – Parámetros microbiológicos para el control microbiológico de frutas y otros vegetales.....	7
<b>Tabla 3</b> Composición fisicoquímica y nutricional del queso fresco en 100 gramos.....	7
<b>Tabla 4</b> Norma Boliviana – Parámetros microbiológicos para el control microbiológico de queso fresco.....	8
<b>Tabla 5</b> Norma Chilena – Parámetros microbiológicos para el control microbiológico de queso fresco.....	9
<b>Tabla 1</b> Búsqueda de matriz libre del analito objeto de estudio.....	23
<b>Tabla 2</b> Búsqueda de matrices para la puesta en marcha de los métodos evaluados.....	24
<b>Tabla 3</b> Cepas ATCC utilizadas para el estudio.....	29
<b>Tabla 4</b> Cepas nativas utilizadas como interferentes.....	29
<b>Tabla 1</b> Recuperación de enterobacterias por los métodos de referencia y alternativo...	36
<b>Tabla 2</b> Recuperación de <i>Escherichia coli</i> por los métodos de referencia y alternativo....	37
<b>Tabla 3</b> Inhibición de bacterias diferentes a enterobacteriaceae.....	38
<b>Tabla 4</b> Inhibición de bacterias diferentes a <i>Escherichia coli</i> .....	39
<b>Tabla 5</b> Límite de Cuantificación para el recuento de enterobacterias y <i>Escherichia coli</i> por el método de referencia y alternativo.....	40
<b>Tabla 6</b> Recuento de enterobacterias y <i>Escherichia coli</i> , en 15 muestras de queso fresco, procedentes de 5 mercados populares de la ciudad de La Paz.....	49
<b>Tabla 7</b> Recuento de enterobacterias y <i>Escherichia coli</i> , en 15 muestras de frutilla, procedentes de 5 mercados populares de la ciudad de La Paz.....	50

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

<b>AFNOR</b>	Asociación francesa de normalización
<b>AOAC</b>	Asociación Oficial de Agroquímica
<b>APA</b>	Asociación Americana de Psicología
<b>ARNCVL</b>	Agar rojo neutro cristal violeta lactosa
<b>ARNCVG</b>	Agar rojo neutro cristal violeta glucosa
<b>ATCC</b>	Colección americana de cepas
<b>Atm</b>	Atmósfera
<b>Aw</b>	Actividad agua
<b>c</b>	Símbolo que representa el número máximo permitido de unidades de muestra rechazables en un plan de muestreo de 2 clases o unidades de muestra provisionalmente aceptables en un plan de muestreo de 3 clases
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>DS</b>	Desviación estándar
<b>EBA</b>	Empresa Boliviana de Alimentos
<b>ETA</b>	Enfermedad de Transmisión Alimentaria
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>FDA</b>	Fundación de medicamentos y alimentos
<b>g</b>	Gramos
<b>H<sub>0</sub></b>	Hipótesis nula
<b>H<sub>1</sub></b>	Hipótesis alterna
<b>Log</b>	Logaritmo
<b>m</b>	Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable de un lote alimentario
<b>M</b>	Símbolo que representa que los valores de recuentos microbianos superiores a "M" son inaceptables, representando el alimento un riesgo para la salud
<b>min</b>	Minuto
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro

<b>n</b>	Número de unidades de muestra requeridas para realizar el análisis de un lote alimentario
<b>ICMSF</b>	Comisión Internacional para Especificaciones Microbiológicas en Alimentos
<b>ISO</b>	Organización Internacional de Estandarización
<b>IBNORCA</b>	El Instituto Boliviano de Normalización y Calidad
<b>LQ</b>	Límite de cuantificación
<b>NB</b>	Norma Boliviana
<b>NB:32014</b>	Norma Boliviana para el recuento de Enterobacterias – Método de recuento en placa
<b>NB:32005</b>	Norma Boliviana para el recuento de bacterias coliformes y <i>Escherichia coli</i> - Método de recuento en placa
<b>NB:32020</b>	Norma Boliviana para el recuento de coliformes y <i>Escherichia coli</i> en alimentos, por placa seca rehidratable - Método Petrifilm™
<b>NC</b>	Nivel de confianza
<b>AOAC Official Method 2006.01</b>	Método Internacional para el recuento de enterobacterias por placa seca rehidratable - Método Petrifilm™
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>p</b>	Probabilidad
<b>Petrifilm™</b>	Placas 3M™ Petrifilm™
<b>pH</b>	Potencial de hidrogeniones
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>r</b>	Coefficiente de correlación
<b>RELOAA</b>	Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos
<b>s</b>	Segundo
<b>SELADIS</b>	Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud
<b>SD</b>	Repetibilidad analítica
<b>Tn</b>	Tonelada
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias

## RESUMEN

Las placas 3M™ Petrifilm™ son un medio de cultivo microbiológico que contiene nutrientes, agentes selectivos y diferenciales; promueven el desarrollo de microorganismos en diferentes matrices. El uso de estas placas como método alternativo, optimiza recursos de laboratorio, siendo eficientes frente a los métodos de referencia de cultivo en agar.

El objetivo de este trabajo fue verificar el desempeño de las placas Petrifilm™, para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli*; en muestras de queso y frutilla fresca.

La metodología se desarrolló en base a la Norma ISO 16140-2:2016 “Protocolo para la Validación de métodos alternativos registrados, frente a los métodos de referencia”; posteriormente se puso a prueba el método, analizando 15 muestras de queso y frutilla fresca procedente de mercados populares de la ciudad de La Paz.

Los resultados evidenciaron, que la inclusividad entre el método alternativo y de referencia para enterobacterias fue (98%; 97%), para *Escherichia coli*: (96%; 96%) respectivamente. La exclusividad de ambos métodos fue del 100%.

En la verificación del recuento de enterobacterias por el método alternativo según las matrices analizadas: el Limite de Cuantificación (LC) y la relación lineal en la veracidad relativa (r) en queso fue: 20 UFC/g; 0,99. En frutilla >20 UFC/g; 0,98 respectivamente. El perfil de precisión (AP) de ambos métodos en 6 niveles de contaminación comprendidos de  $1,6 \times 10^3$  a  $5,0 \times 10^1$  diluidos a intervalos de  $\frac{1}{2}$ ; mostraron mayor sesgo en el último nivel  $1,6 \times 10^3$  (-0,029) en queso y en la frutilla en el primer nivel  $1,6 \times 10^3$  (-0,075).

El recuento de *Escherichia coli* en queso y frutilla, evidenció un LC >20 UFC/g, la r: 0,98; 0,97 respectivamente. El AP tiene mayor sesgo en el último y primer nivel para el queso y la frutilla respectivamente. Los resultados en las muestras de mercados populares guardaron relación estadística con los datos del desempeño de los métodos evaluados.

En conclusión, El 100% de los resultados de las placas Petrifilm™, estuvieron dentro de los Límites de Aceptabilidad y Criterios de Aceptación de la Norma ISO 16140-2:2016 para las matrices y cepas ensayadas. La relación lineal entre los métodos evaluados, para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli* en queso fresco no mostro diferencias estadísticamente significativas, contrario a la Frutilla.

### ***Palabras clave***

Verificación del desempeño, método de referencia, método alternativo, 3M™ Petrifilm™, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, queso fresco, frutilla fresca.

## SUMMARY

3M™ Petrifilm™ plates are a microbiological culture medium containing nutrients, selective and differential agents; They promote the development of microorganisms in different matrices. The use of these plates as an alternative method optimizes laboratory resources, being efficient compared to reference methods of agar culture.

The objective of this work was to verify the performance of Petrifilm™ plates for the count of *enterobacteriaceae* and *Escherichia coli*; in samples of cheese and fresh strawberry.

The methodology was developed based on the ISO 16140-2:2016 Standard "Protocol for the Validation of Registered Alternative Methods, Against Reference Methods"; Subsequently, the method was put to the test, analyzing 15 samples of cheese and fresh strawberries from popular markets in the city of La Paz.

The results showed that the inclusivity between the alternative and reference method for *enterobacteriaceae* was (98%; 97%), for *Escherichia coli*: (96%; 96%) respectively. The exclusivity of both methods was 100%.

In the verification of the *enterobacteriaceae* count by the alternative method according to the matrices analyzed: the Limit of Quantification (LC) and the linear relationship in the relative veracity (r) in cheese was: 20 CFU/g; 0.99. Strawberries >20 CFU/g; 0.98 respectively. The accuracy profile (AP) between the two methods at 6 contamination levels ranging from  $1.6 \times 10^3$  to  $5.0 \times 10^1$  diluted at 1/2 intervals; They showed a greater bias in the last level  $1.6 \times 10^3$  (-0.029) in cheese and in strawberries in the first level  $1.6 \times 10^3$  (-0.075).

The count of *Escherichia coli* in cheese and strawberries, showed a LC >20 CFU/g, r: 0.98; 0.97 respectively. The AP has a higher bias in the last and first levels for cheese and strawberries respectively. The results in the popular market samples were statistically related to the performance data of the methods evaluated.

In conclusion, 100% of the results of the Petrifilm™ plates were within the Acceptability Limits and Acceptance Criteria of the ISO 16140-2:2016 Standard for the matrices and strains tested. The linear relationship between the methods evaluated, for the count of *enterobacteriaceae* and *Escherichia coli* in fresh cheese, did not show statistically significant differences, contrary to strawberry.

### **Keywords**

Performance verification, reference method, alternative method, 3M™ Petrifilm™, *enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, fresh cheese, fresh strawberry.

## 1. INTRODUCCIÓN

En Bolivia el consumo de queso y frutilla fresca, aumenta progresivamente por su composición nutricional y mayor demanda; no obstante, estos alimentos pueden promover el crecimiento de enterobacterias y *Escherichia coli*; constituyéndose en un factor de riesgo para la salud, porque su recuento en altas concentraciones, es presuntivo de la presencia de agentes patógenos del mismo grupo como *Salmonella* y *Shigella*, causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS). (UNICOM-MDPyEP-PRO BOL, 2021, p. 1)

Los Organismos Oficiales de control de Vigilancia Epidemiológica en alimentos contaminados asociados a ETAS, trabajan sobre los reportes de Laboratorios de análisis de alimentos; esta información coadyuva a la Inocuidad Alimentaria, al obtener resultados estadísticos que permitan tomar medidas preventivas y gestionar políticas sanitarias gubernamentales; los métodos analíticos usados, son un factor influyente en los reportes.

En el mercado existen diversos métodos de recuento microbiológico, como las placas Petrifilm™; descartables, biodegradables y optimizan recursos de laboratorio como el tiempo. (Petrifilm™, 2006, p. 14). No obstante, antes de implementarlo deben ser verificados en función a la Norma ISO 16140-2:2016, que proporciona los pasos para evaluar el desempeño en métodos alternativos de uso rápido y/o más fácil que el método de referencia correspondiente”. (UNE-EN ISO 16140-2, 2016, p.4)

La verificación de los métodos de ensayo permite dar cumplimiento al punto 7.2 de la NB/ISO/IEC 17025:2018, “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”; coadyuvando con la aplicación del Sistema de Gestión de Calidad, para la emisión de resultados confiables. (ISO/IEC 17015, 2017, p. 6)

Por esta razón, este trabajo verificó el desempeño de las placas Petrifilm™ en relación a los métodos convencionales de las Normas Bolivianas: 32014:2004 y 32005:2002, para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli* correspondientemente, en alimentos frescos como queso y frutilla de expendio en ciudad de La Paz, gestión 2021.

## 2. MARCO TEÓRICO

La microbiología es el estudio de un grupo grande y diverso de microorganismos que viven en forma de células aisladas o en grupos que comprenden bacterias, hongos, parásitos y virus, todos estos forman parte del medio ambiente. (Jawetz, 2017, p. 15)

La Microbiología de Alimentos estudia microorganismos que se encuentran presentes en las matrices alimentarias, incluyendo los aspectos microbiológicos de la seguridad y de la calidad de los mismos, para su consumo. (Códex Alimentarius, 2015, p. 12)

Las enfermedades alimentarias son transmitidas a los humanos por la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos patógenos, procedentes de la mala manipulación de alimentos y materias primas crudas, entre otras fuentes. Los microorganismos contaminantes, son inactivados mediante tratamientos térmicos, prácticas higiénicas de operación y control de tiempo de almacenamiento para resguardar la inocuidad alimentaria. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2015, p. 45)

### 2.1 Inocuidad alimentaria

Es un conjunto compuesto por cuatro grupos básicos como las: nutricionales, microbiológicas, organolépticas y comerciales, muestran la calidad de los alimentos, siendo garantía de que su consumo no causará daño al consumidor. Cuando se rompen las reglas de la misma, se constituye la contaminación alimentaria que será evidenciada con un análisis de indicadores sanitarios. (Instituto de Salud Pública, 2017, p.12).

### 2.2 Indicadores sanitarios

Son microorganismos que actúan como índice para evaluar prácticas no sanitarias y revelar defectos de la producción de alimentos, entre ellos se encuentran los: mesófilos aerobios, enterobacterias, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, mohos y levaduras, entre otros. No son patógenos por sí mismos, pero su recuento fuera de norma significa un riesgo sanitario por la presencia

presuntiva de agentes patógenos, significando un peligro potencial para la salud humana, donde están más comprometidos los grupos de riesgo. (FAO, 1996, p.34)

### **2.3 Grupos de riesgo**

Son grupos de personas propensas a sufrir enfermedades de transmisión alimentaria, entre ellos: niños, mujeres embarazadas, personas de la tercera edad e inmunodeprimidos. Los niños menores de 5 años son afectados en un 40% por ETAS; al no tener un sistema inmune bien desarrollado, causando anualmente 125.000 defunciones a nivel mundial. (OMS, 2019, p.5)

### **2.4 *Enterobacteriaceae***

La familia de las enterobacterias, son un grupo heterogéneo y extenso de bacterias cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano, animales de sangre caliente, encontrándose distribuidos en el medio ambiente. Comprenden los siguientes géneros (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Proteus* y *Escherichia coli*); este último es parte de la microbiota entérico humana y puede originar enfermedades agudas dependiendo del serotipo presente en el alimento, asimismo, algunas especies de *Salmonella* y *Shigella*, son patógenas y causantes de diarreas entero invasivas. (Jawetz, 2017, p. 218)

#### **2.4.1 *Ecología***

Son bacilos Gram negativos anaerobios facultativos, crecen a temperaturas que oscilan entre 20 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C, móviles o inmóviles por sus flagelos, reducen nitratos a nitritos, catalasa positiva, oxidasa negativa, utilizan glucosa como fuente de hidratos de carbono, realizan un proceso metabólico de fermentación por la vía de Embden-Meyerhoff: se diferencian en fermentadoras y no fermentadoras de lactosa, con o sin producción de gas. (Norma Boliviana 32014, 2014, p. 1). Poseen una estructura antigénica compleja y factores de virulencia mediados por adhesinas, toxinas, cápsulas, plásmidos y captación de hierro. (Jawetz, 2017, p. 219)

## **2.4.2 Patogenia**

En el grupo de enterobacterias, está presente *Salmonella Typhi*, *Shigella dysenteriae* y *Escherichia coli* O157:H7, son causales comunes de infecciones gastrointestinales, como la enteritis y la diarrea, cursan con náuseas, vómitos, dolor de cabeza y fiebre, pueden llegar a infectar las vías urinarias. De la misma forma, los traumatismos cutáneos o de mucosas permiten el acceso a tejidos blandos, la posterior aspiración hacia los pulmones, causaría infecciones asociadas a neumonía, pasando finalmente a torrente sanguíneo y concluyendo con una sepsis mortal. (Ray & Kenneth, 2017, p. 204)

## **2.5 Escherichia coli**

### **2.5.1 Ecología**

Es un bacilo Gram negativo, puede ser móvil o inmóvil por sus flagelos, considerado como un indicador de contaminación de origen fecal. Es anaerobio facultativo, por lo cual su requerimiento nutricional se basa en la fermentación de azúcares como la xilosa, lactosa y sacarosa, produciendo una mezcla de ácidos y gas, se desarrolla a temperaturas entre 8 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C, pH entre 4,4 a 9,5: su Aw de 0,94 a 0,99. No es un microorganismo exigente, por lo tanto, puede alcanzar dosis altas en alimentos como el queso y las frutas frescas. (Jawetz, 2017, p. 228)

### **2.5.2 Patogenia**

No son patógenos, sin embargo, *E. coli* serotipo O157:H7 productor de toxina Shiga (STEC), es un patógeno oportunista productor de enfermedad, que causa calambres abdominales y diarrea, puede progresar a diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica) acompañado de fiebre y vómitos. (OMS, 2018, p. 2)

La colitis hemorrágica puede evolucionar en un 10% de los casos a síndrome hemolítico y urémico (SHU) en niños y ancianos, o púrpura trombocitopénica trombótica en adultos, una enfermedad que consiste en un trastorno de la sangre provocando la formación de coágulos en pequeños vasos sanguíneos, lleva a un bajo conteo plaquetario

(trombocitopenia). También existen otros serotipos patógenos de *E. coli*, no O157 productoras de (STEC) como O55, O111, O26, O103:H2 y O148:H8. (Canet, 2020, p.1)

## 2.6 Importancia del consumo de la frutilla

La frutilla, es un alimento que contiene importantes propiedades energizantes y antioxidantes, tiene una alta dosis de vitaminas, minerales, fibra, (véase Tabla 1) además de ser rica en fitonutrientes que permiten contrarrestar los efectos de los radicales libres, que son algunos de los causantes de ciertos tipos de cáncer. (Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, 2023, p.1). esta fruta facilita la absorción del hierro de los alimentos por parte del organismo y promueve la producción de anticuerpos, mejorando de este modo las funciones del sistema inmunológico. (Mercoop, 2022, p.12)

**Tabla 1 Composición fisicoquímica y nutricional de la frutilla en 100 gramos**

Composición	En 100 g	Nutrientes	Cantidad en mg
<b>pH</b>	3,2 – 4,0	<b>Sodio</b>	1.4
<b>Acidez (% de ácido cítrico)</b>	1,06%	<b>Calcio</b>	21.47
<b>Aw</b>	0,99	<b>Hierro</b>	0.46
<b>Calorías</b>	32.24 g	<b>Fósforo</b>	26
<b>Carbohidratos</b>	5.51 g	<b>Vitamina B1</b>	0.03
<b>Proteínas</b>	0.81 g	<b>Vitamina B2</b>	0.05
<b>Fibra</b>	1.68 g	<b>Vitamina B3</b>	0.79
<b>Grasas</b>	0.4 g	<b>Vitamina C</b>	54.93

Fuente: *Vegaffinity*, 2021, (<https://www.vegaffinity.com/comunidad/alimento/fresa-beneficios-informacion-nutricional>).

Esta fruta se adapta a todo tipo de suelos y climas. (Clarín, 2016, p. 1). En Bolivia la mayor demanda de frutilla está en los departamentos de Santa Cruz, La Paz y Cochabamba. En octubre del 2016, el CIDES UMSA, ha considerado incorporar el consumo de esta fruta como parte del desayuno escolar por sus características nutricionales. (Guzmán, 2016, p. 2)

### 2.6.1 Características de la frutilla como factor de riesgo sanitario

La ilustración muestra la cadena de producción de la frutilla como planta rastrera<sup>1</sup>, esto significa un factor de riesgo de contaminación natural, desde la granja a la mesa además esta fruta tiene una superficie porosa e irregular que dificulta su adecuado proceso higiénico, promoviendo la acumulación de microorganismos, que pueden desarrollarse en la fruta por su composición nutricional (véase Tabla 1) que no requiere cocción para su consumo.

#### Ilustración 1. Cadena de producción de la frutilla



Fuente: Elaboración propia

### 2.6.2 Requisitos microbiológicos - Frutas y verduras

Bolivia aún no cuenta con la Norma que exija realizar el control microbiológico de frutas y verduras frescas listas para consumo, sin embargo, otras normas internacionales como el Reglamento Sanitario de Alimentos de Chile (DTO. N° 977/96), si realiza este control, bajo las recomendaciones enmarcadas en la Norma ISO 16140-2:2016. (UNE-EN ISO 16140-2, 2016, p. 37)

La Norma Chilena determina los parámetros y límites de recuento microbiológico de enterobacterias y *Escherichia coli*, para el análisis de frutas listas para consumo. (Véase Tabla 2)

<sup>1</sup> Es aquella planta que no superan los 30 o 50 centímetros de altura

**Tabla 2 Norma Chilena – Parámetros microbiológicos para el control microbiológico de frutas y otros vegetales**

Alimento	Norma de referencia	Parámetros	Límites microbiológicos	
Frutas y otros vegetales comestibles pre elaborados, listos para el consumo	NORMA CHILENA 2017	Enterobacterias	m:5x10 <sup>4</sup>	M: 5x10 <sup>5</sup>
		<i>E. coli</i>	m: 10	M: 10 <sup>2</sup>

Fuente: Ministerio de salud de la república de Chile, (p. 105), 2017, (DTO. 977/96)

### 2.7 Importancia del consumo de queso fresco

El queso es un alimento de alto valor nutricional, es buena fuente de vitaminas, grasas y minerales. (Véase Tabla 3) Las proteínas que aporta son adecuadas para el consumo humano, en especial para niños, mujeres embarazadas y las personas de la tercera edad, (Palancares, 2021, p.1) actualmente este alimento es distribuido en mercados populares, industria alimentaria y también por el Ministerio de Salud de Bolivia, dentro del “Plan del Subsidio Universal Prenatal y de lactancia por la vida”. (Seguro Social Universitario , 2020, p.1)

**Tabla 3 Composición fisicoquímica y nutricional del queso fresco en 100 gramos**

Composición	Por cada 100 g	Nutrientes	Cantidad en mg
Temperatura de venta	8 - 25 °C	Fibra (g)	0
pH	4,9 – 6,1	Calcio (mg)	338
Acidez (% de ácido láctico)	0,56%	Hierro (mg)	0,5
Humedad	42,7 – 66,7 %	Yodo (µg)	4,8
Aw	0,90	Magnesio (mg)	16
Energía (kcal)	198	Sodio (mg)	272
Proteínas (g)	12,4	Potasio (mg)	121
Lípidos totales (g)	15,4	Fosforo (mg)	170
Hidratos de Carbono (g)	2,5	Vitamina A (µg)	194

Fuente: Nutrigame (p.2), 2016, (<https://nutrigame.es/queso-fresco/>)

### 2.7.1 Características del queso fresco como factor de riesgo sanitario

El queso fresco es de mayor consumo a diferencia de los diferentes tipos de queso madurados; debido a su fácil producción, sin embargo, dentro de este proceso pueden existir malas prácticas de manipulación desde la recolección, elaboración, distribución y almacenamiento, constituyéndose en un riesgo sanitario para las personas que lo consumen. Sus propiedades nutricionales e intrínsecas (véase Tabla 3); son fuente para el crecimiento y desarrollo de microorganismos, además este alimento no requiere cocción para su consumo.

### 2.7.2 Requisitos microbiológicos de los productos lácteos - Queso fresco

Dentro de los parámetros microbiológicos para el control sanitario del queso fresco (véase Tabla 4), la Norma Boliviana 33009:2003, considera la búsqueda de indicadores sanitarios, como recuento de *Staphylococcus aureus*, coliformes totales, y *Escherichia coli*, también agentes patógenos como: *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*, el análisis de laboratorio de estos últimos parámetros microbiológicos significa un costo económico elevado, porque la detección de agentes patógenos, requiere el uso de medios enriquecidos, marchas microbiológicas largas y condiciones especiales de incubación.

**Tabla 4 Norma Boliviana – Parámetros microbiológicos para el control microbiológico de queso fresco.**

Alimento	Norma de referencia	Parámetros	Limites microbiológicos
Queso fresco NB 33009: 2003	NB 32005	<i>Coliformes totales</i>	1x10 <sup>3</sup> UFC/g
		<i>Escherichia coli</i>	10 UFC/g

Fuente: Norma Boliviana 33009:2003 productos lácteos - Queso fresco

Nota: En los parámetros de recuento de indicadores sanitarios analizados por la Norma Boliviana, no se contempla el recuento de enterobacterias.

La Norma ISO 16140-2:2016, dentro de la “Clasificación de muestras y su relevancia para las pruebas de varios microorganismos” sugiere realizar el análisis de enterobacterias como un indicador sanitario en queso fresco; porque permite al consumidor obtener un

recuento de microorganismos fermentadores y no fermentadores de lactosa en menor tiempo y podría ser indicador presuntivo de la presencia de microorganismos patógenos. (UNE-EN ISO 16140-2, 2016, p. 32)

Dentro de los parámetros de recuento microbiológico de indicadores sanitarios objeto de estudio, según la Norma Chilena, se realiza el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli*. (Véase Tabla 5)

**Tabla 5 Norma Chilena – Parámetros microbiológicos para el control microbiológico de queso fresco.**

Alimento	Norma de referencia	Parámetros	Límites microbiológicos	
Quesillo, queso fresco, queso chacra, queso de suero	NORMA CHILENA 2017	Enterobacterias	m:2x10 <sup>3</sup>	M: 10 <sup>4</sup>
		<i>Escherichia coli</i>	m: <3	M: 10

Fuente: Ministerio de salud de la república de Chile, (p. 97), 2017, (DTO. 977/96).

## 2.8 Métodos de análisis microbiológico de referencia

### 2.8.1 Recuento en placa para enterobacterias – NB 32014:2004

#### Principio del método

Este método se basa en la detección de los organismos fermentadores de glucosa y oxidasa negativos, a partir de su crecimiento en agar bilis glucosa rojo neutro, cristal violeta, las sales biliares inhiben el crecimiento de la microbiota Gram (+). Las enterobacterias fermentan glucosa, por la ruta glucolítica de Embden Meyerhof; fosforilan la glucosa, formando ácido pirúvico, que acidifica el medio de cultivo donde el indicador de pH cambia de color produciendo colonias púrpuras de 1-2 mm de diámetro, asociadas o no a la producción de gas, rodeadas de halos de color rosa por la precipitación de las sales biliares. (Norma Boliviana 32014, 2014, p. 2)

El análisis requiere diluciones decimales de la muestra en agua peptonada y siembra en profundidad, de 1 ml en caja petri vertiendo encima el agar a una temperatura de  $45\pm 2^{\circ}\text{C}$  y posterior incubación a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

### ***2.8.2 Recuento en placa para *Escherichia coli* – NB 32005:2002***

#### **Principio del método**

Este método se basa en la capacidad que tienen los coliformes de fermentar hidratos de carbono como lactosa, a través de la vía metabólica de fermentación láctica, con producción de ácido y gas, a una temperatura de  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ . El Agar rojo neutro cristal violeta lactosa (ARNCL) contiene peptona y extracto de levadura, aportando nutrientes para el crecimiento bacteriano, las sales biliares y cristal violeta inhiben el desarrollo de la microbiota Gram (+) el rojo neutro es el indicador de pH. (BRITANIA, 2021, p. 1)

Este método requiere diluciones decimales de la muestra en agua peptonada y siembra en profundidad de 1 ml en cajas petri, vertiendo encima el agar ARNCL y posterior a la incubación a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 horas, las colonias de *Escherichia coli*, presentan las siguientes características:

Color rosado/purpura, de diámetro 1 – 2 mm, con un halo de precipitación de sales biliares, se confirma sembrando las colonias presuntivas en medios selectivos y diferenciales como el caldo Verde Brillante y caldo *Escherichia coli*, por 24 a 48 horas a una temperatura de  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $44,5\pm 2^{\circ}\text{C}$  respectivamente. (IBNORCA, 2002, p. 2)

## **2.9 Métodos de análisis microbiológicos alternativos**

### ***2.9.1 Recuento de Enterobacterias - AOAC Official Method 2006.01 por placa Petrifilm™***

#### **Principio del método**

Es una placa seca rehidratable conformada de dos films: el inferior contiene los nutrientes del medio agar (Cristal violeta, rojo neutro, bilis, glucosa modificado), el film superior tiene un agente gelificante soluble en agua fría y adhesivos, el indicador de color (2,3,5

tricloruro de trifeniltetrazolio: rojo de clorofenol (TTC)), facilita la enumeración de enterobacterias; por la fermentación de glucosa y producción de ácido pirúvico que acidifica el pH causando cambio de color del medio a rojo. El film superior permeable favorece la difusión del oxígeno y retiene el gas formado por las enterobacterias. (Petrifilm™, 2006, p. 54)

Este método aplica diluciones decimales de la muestra en agua peptonada o agua peptonada tamponada, transfiriendo 1 ml de dilución a la placa de Petrifilm se aplica presión con el difusor de placa, para su posterior incubación a 35°C +/- 2°C por 24 hrs. Posteriormente las bacterias fermentadoras de glucosa muestran las siguientes características:

- ✓ Colonias rojas de 2 mm de diámetro circulares o levemente deformes, rodeadas por una zona amarilla asociadas a burbujas de gas.
- ✓ Colonias rojas de 2 mm de diámetro circulares, rodeadas por una zona amarilla sin burbujas de gas.

### ***2.9.2 Recuento de Escherichia coli – NB 32020:2005 por placa Petrifilm™***

#### **Principio del método:**

Es una placa seca rehidratable conformada de dos films: el inferior contiene los nutrientes del medio cristal violeta, rojo neutro, bilis, lactosa modificada, el indicador 5-bromo-4-cloro-3-indolilbeta-D-glucurónido (BCIG) y un agente gelificante soluble en agua fría (El área donde se desarrollarán los microorganismos está definida por una película intermedia de espuma). Se complementa en la parte superior con otra lámina de polipropileno que contiene gel soluble en agua fría y tricloruro de trifenil tetrazolio (o TTC) como indicador. (3M, 2006, p.2)

Este método se basa en la propiedad, que tienen *E. coli* para fermentar lactosa y producir beta-glucuronidasa, ácido y gas. Se realizan diluciones decimales de las muestras en medios tamponados, se transfiere 1 ml a la placa, procediendo a la incubación a 35°C

±2°C por 24 horas para el recuento de coliformes totales y adicionando 24 horas para el recuento de *E. coli*. Tras la incubación las colonias muestran las siguientes características.

- ✓ Colonias con precipitado azul de 2 mm de diámetro circulares o levemente deformes, asociadas a burbujas de gas.
- ✓ Colonias con precipitado azul de 2 mm de diámetro circulares o levemente deformes, no asociadas a burbujas de gas.

## **2.10 Consideraciones teóricas de las Normas Internacionales aplicadas al Laboratorio**

La Organización Internacional de Normalización (ISO), es una federación mundial de organismos nacionales de normalización, se encargan de la elaboración de Normas Internacionales a través de sus comités técnicos. Cada organismo miembro, está interesado en un tema para el cual se haya establecido un comité técnico, tiene derecho a tener representación participativa. Las organizaciones internacionales, gubernamentales y no gubernamentales, en coordinación con ISO, también participan en el trabajo de campo evaluativo de la conformidad. ISO colabora estrechamente con la Comisión Electrotécnica Internacional (IEC) en la normalización electrotécnica. (ISO, 16140-2:2016, p.4)

## **2.11 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración - Norma NB/ISO/IEC 17025:2018**

En el apartado 7.2 de “Selección, Verificación y Validación de métodos usados en el laboratorio”; establece que “El laboratorio debe validar o verificar los métodos normalizados, no normalizados, desarrollados por el laboratorio y/o los métodos modificados de otra forma. La evaluación del desempeño analítico del método usado, debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de aplicación dados”; esto con la finalidad de emitir resultados confiables para el cliente. (Norma Internacional, NB/ISO/IEC 17025, 2018, p. 22)

## **2.12 Validación**

La validación permite demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se busca utilizar, también permite demostrar técnicamente que un método es equivalente a otro, así mismo demostrar si las modificaciones que pudieron haberse realizado en un método de análisis, no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados emitidos, para dar cumplimiento a las normas de calidad nacionales e internacionales. (Boris Duffau, 2010, p. 10)

Las normas técnicas para realizar el estudio de comparación de métodos y el estudio Inter laboratorio se dan dependiendo del tipo de validación que se vaya a realizar:

### ***2.12.1 Tipos de validación***

#### ***2.12.2 Validación inicial o completa***

Es un proceso exploratorio que tiene como meta establecer los límites operacionales y las características de desempeño de un método nuevo o modificado. Debe dar origen a especificaciones numéricas y descriptivas para el desempeño e incluir una descripción detallada y precisa del objeto de interés. Los laboratorios que desarrollan un método “in house” o una variante de una norma existente, deben realizar los pasos de la validación primaria (GTC 84, 2003, p.15).

#### ***2.12.3 Validación secundaria o verificación***

La verificación es la comprobación del funcionamiento de un método alternativo sin alterar el protocolo normativo; es realizado por el laboratorio de control que va a utilizar el método alternativo, el mismo debe ser capaz de cumplir con los requisitos de funcionamiento del método establecido, en las condiciones habituales del trabajo donde se verificará el método. (UNE-EN ISO 16140-2:2016, p.16)

Según la guía técnica “Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición”, del Instituto de Salud Pública – Chile; para llevar adelante un plan de validación o verificación, el responsable debe seguir los siguientes pasos:

#### ***2.12.4 Establecimiento de un plan de verificación***

Corresponde a un documento (tipo protocolo) en el cual se define las pruebas o parámetros de verificación necesarios y el diseño experimental a desarrollar en base a los requerimientos del método. (Instituto de Salud Publica, 2010, p.24)

#### ***2.12.5 Elección del analista responsable de realizar las pruebas analíticas***

El laboratorio debe asegurarse de que el personal encargado del proceso de verificación este calificado y sea competente para realizar las actividades demandadas con la finalidad de obtener mayor precisión y resultados confiables. (NB/ISO/IEC 17025, 2018, p. 6)

#### ***2.12.6 Elección de matrices***

Lo ideal es trabajar con muestras naturalmente contaminadas o al menos que tengan una distribución microbiológica o interferencia correspondiente al analito de análisis. Si no es posible trabajar con alimentos naturalmente contaminados se debe recurrir a la contaminación artificial con microorganismos diana o en último caso, al empleo de materiales de referencia. (Fornés, 2014, p. 6)

#### ***2.12.7 Elección de categorías a utilizar***

La selección de categorías y tipos de alimentos utilizados dentro de la verificación dependerá del tipo o grupo de microorganismos a ser analizados y del alcance de la verificación.

#### ***2.12.8 Elección de cepas***

Las cepas utilizadas en el proceso de verificación, deben ser caracterizadas bioquímicamente para que se conozca su identidad. Se puede usar cepas ATCC, aisladas de alimentos, piensos, de muestras clínicas y ambientales, teniendo en cuenta el alcance de la verificación. Posteriormente se debe identificar y guardar las cepas para su posterior uso. (UNE-EN ISO 16140-2, 2016, p. 9)

### **2.13 Parámetros analíticos para la verificación del desempeño de un método cuantitativo según Norma ISO 16140-2:2016**

El proceso de verificación según la norma ISO 16140-2:2016, esté compuesto por cuatro partes:

1. Estudio de inclusividad: es un estudio que involucra el análisis de al menos 50 cepas cultivadas de microorganismos (objetivo) para ser recuperadas por el método evaluado. Mientras que el estudio de exclusividad involucra el análisis de al menos 30 cepas cultivadas de microorganismos (no objetivo), que pueden tener una reacción cruzada potencial, pero no se espera que sean recuperadas o detectadas por el método evaluado.
2. El límite de cuantificación (LOQ): es la mínima cantidad de analito que puede ser cuantificado por un método analítico, para evaluar los resultados del método alternativo en muestras contaminadas artificialmente, se utiliza mínimamente 10 réplicas de un solo elemento por categoría.
3. El estudio de veracidad relativa (r): es el grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método de referencia y el método alternativo en muestras idénticas, se analizan en diferentes categorías, tipos y elementos para el estudio.
4. El estudio del perfil de precisión (AP): es una representación gráfica de la capacidad de medición del método cuantitativo obtenida al combinar intervalos de aceptabilidad e intervalos de tolerancia de expectativa  $\beta$ , ambos reportados a diferentes niveles del valor de referencia, en muestras contaminadas artificialmente utiliza réplicas de un solo tipo de alimento por categoría.

### **2.14 Control de calidad del proceso de verificación**

Permite detectar tendencias y aplicar técnicas estadísticas para la revisión de los resultados, se obtiene información que indique si los métodos son apropiados para el tipo de trabajo que se realiza en el laboratorio, si los datos no satisfacen los criterios predefinidos se deben tomar acciones correctivas para evitar resultados insatisfactorios. (UNE-EN ISO 16140-2, 2016, p. 51)

### 3. ANTECEDENTES

Un análisis realizado por la organización “Environmental Leader Product & Project Awards”, determinó el año 2016, reconocer y premiar la excelencia de las placas Petrifilm™, por proveer beneficios ambientales, de gestión y optimización de costos; esto se publicó en la revista “3M FOOD SAFETY MAGAZINE”; en base a los resultados obtenidos de diferentes trabajos de investigación, concluyendo que: el volumen que ocupa 1 caja de Petri equivale a 20 placas Petrifilm™, reducen 45% el trabajo técnico, utilizan 80% menos de agua, usan un 75% menos de energía, emiten un 75% menos de gases efecto invernadero, producen un 66% menos de residuos y requieren un 85% menos de espacio de laboratorio. (Suarez, 2016, p. 8)

En el estudio realizado por Dariel Intriago y colaboradores el año 2018 en Ecuador, se comparó el desempeño de la placa Petrifilm™ frente al método de referencia Agar triptona de soya, para el recuento de aerobios mesófilos en polvo de cacao, usando las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; en 5 niveles de contaminación. Los resultados mostraron un NC de 95%, una probabilidad estadística en los niveles de UFC/g:  $6 \times 10^1$  ( $p=0,506$ ),  $3,8 \times 10^2$  ( $p=0,843$ ),  $7 \times 10^3$  ( $p=0,378$ ),  $3,6 \times 10^4$  ( $p=0,180$ ) y  $4,0 \times 10^4$  ( $p=0,180$ ), el coeficiente de relación  $r=0,99$ , la precisión  $R_p\% \leq 2,0$  y la recuperación  $\geq 80\%$ . Concluyendo que no hay diferencias significativas entre ambos métodos. (Dariel Intriago; Marco Zambrano, María Bolaños, Ely Sacón, 2018, p.21)

Un estudio realizado por María Sánchez, el año 2018 en Colombia, comparó el método Petrifilm™, frente al método de referencia siembra en Agar todo Propósito (ATP), para el recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) homofermentativas en el análisis de productos cárnicos y no cárnicos. Los resultados mostraron que: el valor “p” fue menor al nivel de significancia encontrado en el test “t de student”; rechazando la hipótesis de igualdad entre los métodos. El porcentaje de recuperación bacteriológica en el ATP y Petrifilm™ fue del 38% y 41% respectivamente, resaltando que el medio alternativo APT mostró un crecimiento bacteriano diferente al esperado a diferencia de las placas

Petrifilm™, donde las características de crecimiento de BAL, permiten un mejor recuento bacteriano en el análisis en productos cárnicos. (Sánchez, 2018, p.8)

Un estudio realizado por Andrés Ávila el año 2021 en Argentina, verificó la efectividad de las placas de Petrifilm™ para el recuento de Mohos y Levaduras, en crema de leche y Tampico, en la planta Jenaro Pérez Cooperativa Colanta. Realizado bajo los protocolos del fabricante. Entre los resultados para la crema de leche y tampico se tiene: Precisión Intermedia: 1.46 y 1.40, Desviación Estándar: 0.126 y 0.089, Coeficiente de Variación: 9% y 6% y Porcentaje de Recuperación: 73% y 73%, Concluyendo, que el rendimiento de las placas Petrifilm™ RYM, es óptimo para ambas matrices de estudio, cumpliéndose con los requisitos de calidad establecidos en la guía del fabricante. (Fuentes, 2021, p. 2)

Un estudio realizado el año 2021 por Maryse Rannou en Francia, validó el desempeño para recuento de enterobacterias en placas Petrifilm™, frente al método de referencia ISO 21528-2; bajo la Norma ISO 16140-2:2016 en 7 categorías de alimentos. El análisis de 171 muestras para el estudio de veracidad relativa, proporcionó 144 resultados interpretables por ambos métodos, cumpliéndose los criterios requeridos. El perfil de precisión se enmarca en los límites de aceptabilidad  $\pm 0,5 \log$  CFU/g. Las pruebas de inclusión y exclusividad mostraron resultados satisfactorios. Concluyendo que el método alternativo se acepta como equivalente al método de referencia. (Rannou, 2021, p. 28)

Un estudio realizado el año 2021 por Maryse Rannou en Francia, validó el desempeño para recuento en Placas Petrifilm™ select *Escherichia coli* count, frente al método de referencia ISO 16649-2; bajo la Norma ISO 16140-2:2016 en 7 categorías de alimentos. En los resultados del estudio de Veracidad Relativa: 152 de 259 muestras tuvieron resultados interpretables por ambos métodos. En el perfil de precisión 35 de 259 muestras estuvieron fuera del Límite de confianza del 95% para el método de referencia. La inclusividad evidenció 9 cepas con crecimiento atípico. La exclusividad fue satisfactoria. Concluyendo que el método alternativo se acepta como equivalente al método de referencia, sin embargo existen diferencias en función al alimento. (Rannou, 2021, p. 31)

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel internacional y nacional, los “Laboratorios de análisis de alimentos”, realizan ensayos microbiológicos, en su mayoría aplicando métodos convencionales como el cultivo en agar, requieren largos procesos de preparado de medios de cultivo, material, uso de equipos e insumos especiales; siendo un factor negativo en las marchas analíticas. Las placas Petrifilm™, son un método de cultivo alternativo validado por la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR) y la Asociación de Analistas Químicos Oficiales (AOAC). (3MPetrifilm™, 2023, p.1)

En Bolivia no se encontraron datos de evaluación del desempeño de las placas Petrifilm™ según Norma ISO 16140-2:2016 para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli* en alimentos frescos como queso y frutilla, situación que limita al laboratorio aplicar este método alternativo con resultados confiables, al no contar con datos estadísticos que permitan satisfacer las necesidades de aplicación de las placas Petrifilm™ en diferentes matrices.

La Red de laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (RELOAA), en su Boletín Informativo Nro. 10, muestra información sobre la “Vigilancia de Contaminantes Microbiológicos” en Bolivia, con datos de contaminación alimentaria por indicadores sanitarios y patógenos. (INLASA, 2021, p. 5-15) Sin embargo no se determina el recuento de enterobacterias en alimentos frescos, como queso y frutilla, cuyas características nutricionales promueven el crecimiento de estos microorganismos. (Guzmán, 2016, p. 2)

La determinación de enterobacterias como Indicador Sanitario, es importante porque contempla además la detección de bacterias no fermentadoras de lactosa, a diferencia del recuento de coliformes que solo promueve el crecimiento de bacterias fermentadoras de lactosa. La ausencia analítica de este parámetro microbiológico, sesga la información al generar falsa seguridad en los resultados de inocuidad alimentaria, que promuevan medidas preventivas o correctivas de las ETAS por los Organismos de control de Vigilancia Epidemiológica.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Las placas Petrifilm™ son un medio de cultivo hecho a base de celulosa biodegradable de uso rápido y fácil, contiene nutrientes, indicadores e inhibidores microbiológicos liofilizados, no necesita la preparación adicional de reactivos, ni el uso de equipos y/o insumos especiales, ocupan poco espacio y gasto de energía, su aplicación requiere previa verificación para generar resultados confiables al conocer los parámetros de desempeño como: la inclusividad y exclusividad muestran la capacidad del método de promover o inhibir el crecimiento de cepas diana. El límite de cuantificación es la mínima concentración de analito en la muestra. La Veracidad Relativa determina el grado de relación lineal entre los métodos evaluados. El Perfil de Precisión evalúa intervalos de aceptabilidad y tolerancia a diferentes niveles. (UNE-EN ISO 16140-2, 2016, 14).

La información estadística de este trabajo, permitirá al laboratorio y otros Organismos, como el IBNORCA, adoptar y normalizar el protocolo de la AOAC para el recuento de enterobacterias por placas Petrifilm™. También sugerirá aumentar el alcance analítico en alimentos frescos listos para el consumo como el análisis de enterobacterias y *Escherichia coli*.

En tema de costos: el de las placas Petrifilm™ es superior al medio de cultivo en agar, pero también se debe considerar el costo eléctrico del uso de equipos, ambientes, insumos y reactivos extras no requerido; resaltando los beneficios ambientales al ahorrar el gasto de agua, energía y espacio. La eficiencia del método alternativo está determinada en función al tiempo de emisión de resultados, por tanto, los laboratorios que lo apliquen de rutina, generarán información eficaz, significando una ventaja para los Organismos de Control de Vigilancia Epidemiológica e Inocuidad Alimentaria, para generar políticas de toma de acciones preventivas y/o correctivas del control de ETAS. (Caravaca, 2018, p.3)

## **6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál será el grado de igualdad estadística entre el desempeño de las placas Petrifilm™ en relación al método de referencia, para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli*, en queso y frutilla fresca?

## 7. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

Hipótesis nula: El desempeño entre las placas de cultivo “PetriFilm™” y el cultivo de referencia, para recuento de enterobacterias y *Escherichia coli*, en queso y frutilla fresca, es estadísticamente igual,  $p > 0.05$

Hipótesis alterna: El desempeño entre las placas de cultivo “PetriFilm™” y cultivo de referencia, para recuento de enterobacterias y *Escherichia coli*, en queso y frutilla fresca, es estadísticamente diferente,  $p < 0.05$

## 8. OBJETIVOS

### 8.1 Objetivo general

Verificar el desempeño de las placas 3M™ Petrifilm™ en relación a la NB: 32014 y NB: 32005 para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli*, en queso y frutilla fresca.

### 8.2 Objetivos específicos

- 1) Obtener los valores estadísticos del desempeño de los métodos de referencia de la NB: 32014 y NB: 32005, en paralelo al método alternativo por placas Petrifilm™ para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli*, en queso y frutilla fresca.
- 2) Evaluar los resultados estadísticos obtenidos por las placas Petrifilm™ en relación al método de referencia, según los parámetros de la Norma ISO 16140-2:2016.
- 3) Evaluar los resultados obtenidos por las placas Petrifilm™ en relación al método de referencia, en queso y frutilla fresca de mercados populares de la ciudad de La Paz.

## 9. DISEÑO METODOLÓGICO

### 9.1 Tipo o diseño del estudio

Estudio analítico correlacional

### 9.2 Sitio o contexto del estudio

El componente práctico se llevó a cabo en el laboratorio de “Microbiología de alimentos” del Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés, de la ciudad de La Paz – Bolivia.

### 9.3 Universo y población o muestra

Se realizó el estudio en alimentos frescos: queso y frutilla listos para consumo. (Véase Tabla 1). La denominación en la clasificación de alimentos se realizó en función a la norma ISO 16140-2:2016; en base a las propiedades intrínsecas y nutricionales de los mismos, por lo cual su clasificación alimentaria, está destinada a orientar a los desarrolladores de los métodos de verificación. (UNE-EN ISO 16140-2, 2016, p. 30)

Se consideraron las muestras que tuvieran una mínima contaminación microbiológica.

La Norma ISO 16140-2:2016, clasifica a los alimentos en estudio, por categoría, tipo de muestra e Ítem, también se especifica la procedencia y cantidad de alimento usado en el proceso de verificación del desempeño. (UNE-EN ISO 16140-2, 2016, p.2)

**Tabla 1 Búsqueda de matriz libre del analito objeto de estudio**

Nro.	Categoría	Tipo	Ítem	Procedencia
1	Productos frescos y frutas	Frutas cortadas, listas para comer	Frutilla	Supermercados de la ciudad de La Paz.
2	Leche, productos lácteos	Productos pasteurizados a base de leche	Queso fresco	Planta de lácteos EBA – Challapata

Fuente: UNE-EN ISO 16140-2, 2016, p.16

Se tomaron aleatoriamente muestras naturalmente contaminadas de queso y frutilla fresca en una cantidad mínima de 250 g procedentes de mercados populares de la ciudad de La Paz, como se muestra a en la Tabla 2.

**Tabla 2 Búsqueda de matrices para la puesta en marcha de los métodos evaluados**

Nro.	Procedencia	Número de muestras de queso fresco y frutilla
1	Mercado del tejtar (MT)	3
2	Mercado Rodríguez (MR)	3
3	Mercado Lanza (ML)	3
4	Mercado Camacho (MC)	3
5	Mercado de Chasqui Pampa (MCP)	3

Fuente: Elaboración propia a partir de muestras de mercado

### 9.3.1 Tamaño de muestra

- ✓ Para la verificación del desempeño del método alternativo, se usaron alrededor de 7.500 g de queso fresco y 7.500 g de frutilla, (véase Tabla 1) el cálculo de la cantidad de muestra, estuvo delimitada en función al protocolo de la norma ISO 16140-2:2016.
- ✓ Para la puesta en marcha de los métodos verificados, se usaron 3.750 g de queso y 3.750 g de frutilla fresca, de mercados populares de la ciudad de La Paz.

### 9.3.2 Criterios de inclusión

Para la búsqueda de Frutilla y queso fresco libre del analito objeto de estudio se cumplieron los siguientes requisitos:

- ✓ Productos frescos
- ✓ Listos para consumo
- ✓ Conservado en cadena de frío
- ✓ Envasados herméticamente
- ✓ Cantidad de muestra mayor a 250 gramos

### **9.3.3 Criterios de exclusión**

No se tomaron en cuenta el queso fresco y frutilla con las siguientes características:

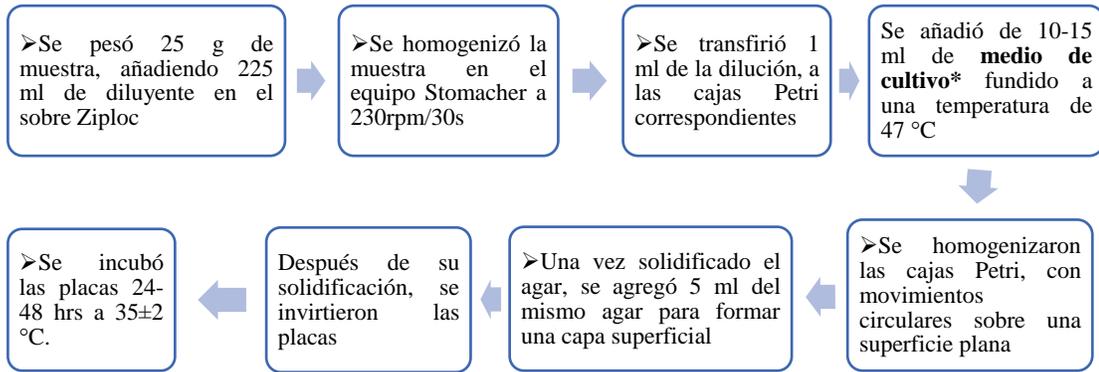
- Daño físico evidente en el alimento y/o envase
- Productos en estado de putrefacción
- Exposición temperaturas elevadas o de congelación
- Quesos maduros, cheddar, Mozzarella, parmesano u otras variedades
- Frutilla recubierta de saborizantes, conservantes y/o procesadas

## **9.4 Descripción de las técnicas y procedimientos más importantes**

### **9.4.1 Muestreo y preparación de las matrices para su análisis**

- En función a los criterios de inclusión y exclusión, se tomaron las muestras de queso y frutilla fresca en recipientes cooler separados por categoría alimentaria, transportándolas en cadena de frío (4°C – 8°C) al Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto SELADIS en un tiempo de 1 a 2 horas.
- Antes de realizar la apertura de los empaques, se realizó un proceso de asepsia sobre los bordes del mismo, usando algodón estéril embebido con etanol al 70%, posteriormente se trasladó las muestras a recipientes estériles para su trozado, homogenización y pesado en sobres ziploc (se sacaron las hojas de las frutillas frescas, antes de su respectivo pesado y procesamiento).

**Ilustración 1 Procedimiento de Siembra en profundidad y recuento en placa, por la NB:32014 para enterobacterias y NB:32005 para *Escherichia coli***



Fuente: Elaboración propia en base a las NB: 32014 y la NB: 32005

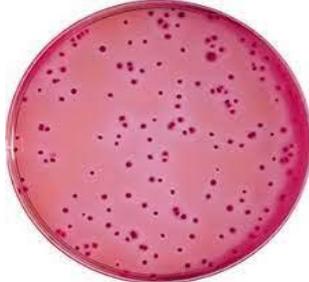
Nota: El tiempo de incubación para enterobacterias fue 24 horas y para *Escherichia coli* 48 horas

\*Medio de cultivo para enterobacterias: Agar rojo neutro cristal violeta glucosa

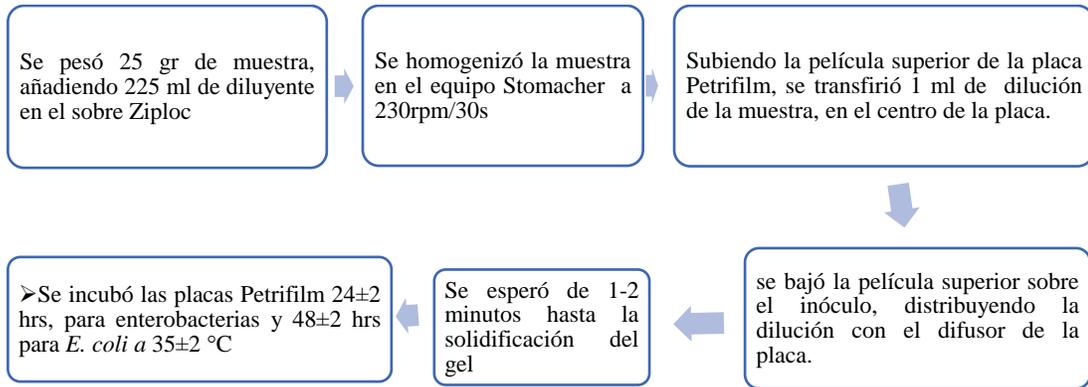
\*Medio de cultivo para *Escherichia coli*: Agar rojo neutro cristal violeta lactosa

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (véase Ilustración 2)

**Ilustración 2 Recuento de UFC en placa, por el método de referencia**

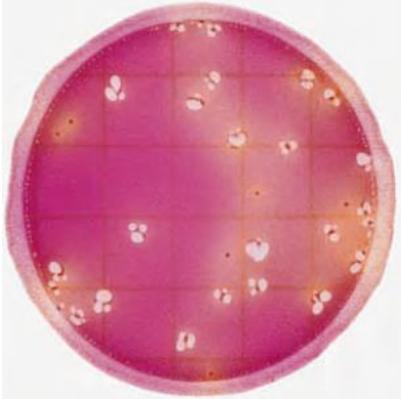
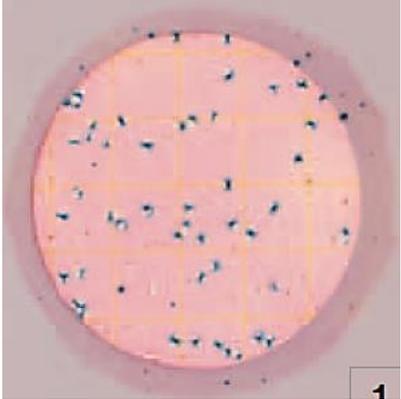
Recuento de enterobacterias	Recuento de <i>Escherichia coli</i>
	
Fuente: <a href="https://thermofisher.com/order/catalog/product/CM1082R">thermofisher.com/order/catalog/product/CM1082R</a>	Fuente: Violet Red Bile Agar (VRBL / VRBA) ColiformesBioser

**Ilustración 3 Procedimiento de siembra en placas Petrifilm™ según la NB:32020 para *Escherichia coli* y AOAC Official Method 2006.01 para enterobacterias**



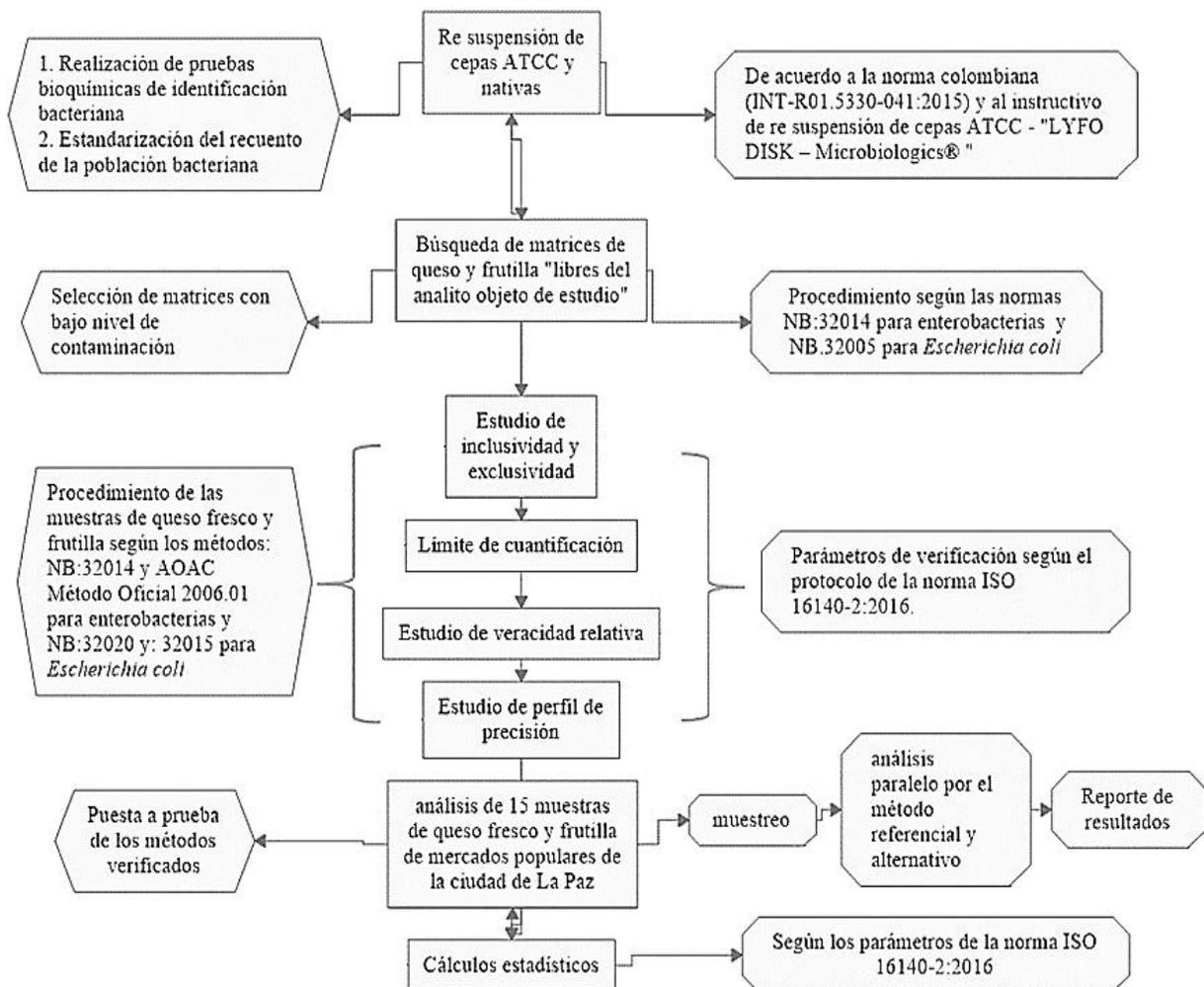
Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). (Véase Ilustración 4)

**Ilustración 4 Recuento de UFC en la placa por las placas Petrifilm™**

Recuento de enterobacterias	Recuento de <i>Escherichia coli</i>
	
<p>Fuente: Guía de uso e interpretación de las placas Petrifilm™, <i>E. coli</i> 2009, p.8</p>	<p>Fuente: Guía de uso e interpretación de las placas Petrifilm™, <i>E. coli</i> 2009, p.21</p>

El siguiente esquema, resume en 3 columnas: en el centro se describe los pasos seguidos en función a normativa, del lado derecho se referencia la normativa de apoyo usada y del lado izquierdo, las actividades realizadas en cada paso del protocolo de verificación del desempeño de los métodos de cultivo microbiológico para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli* en queso y frutilla fresca; en función a los requisitos de la Norma ISO 16140-2:2016.

### Esquema 1. Procedimiento de Verificación



Fuente: Elaboración propia a partir de la norma ISO 16140-2:2016 y las normas de los métodos evaluados.

**Tabla 3 Cepas ATCC utilizadas para el estudio**

Se recuperaron 11 cepas ATCC, proporcionadas por el Instituto SELADIS. (vease Tabla 3) Para su hidratación y siembra, se siguió el protocolo de LYFO DISK Microbiologics® (véase Anexo 1) para el manejo de cepas se usó la Norma Colombiana del “Instituto Nacional de Salud” (INT-R01.5330-041:2015). (véase Anexo 2)

Nro.	Microorganismo	ATCC
1	<i>Bacillus cereus</i>	10876
2	<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048
3	<i>Escherichia coli</i>	10536
4	<i>Listeria monocytogenes</i>	19111
5	<i>Listeria innocua</i>	33090
6	<i>Proteus mirabilis</i>	12453
7	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	10145
8	<i>Salmonella typhimurium</i>	13311
9	<i>Shigella sonnei</i>	25931
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
11	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228

Fuente: Elaboración propia de las cepas del Laboratorio de SELADIS

**Tabla 4 Cepas nativas utilizadas como interferentes**

Para este fin se utilizaron cepas del Instituto SELADIS y cepas nativas de queso y frutilla fresca de mercados populares, también una colaboración de 3 cepas aisladas de INLASA.

N° de cepas	Cepas Nativas	Origen	Procedencia
1	<i>Bacillus spp.</i>	Cereales	SELADIS
4	<i>Citrobacter spp</i>	frutilla, queso, lechuga	SELADIS
3	<i>Enterobacter spp</i>	Queso y lechuga	SELADIS
4	<i>Escherichia coli</i>	frutilla, queso, lechuga y carne de pollo	SELADIS
1	<i>Escherichia coli</i>	O:111	INLASA
1	<i>Escherichia coli</i>	O:145	INLASA
1	<i>Escherichia coli</i>	O:91	INLASA
3	<i>Klebsiella spp</i>	queso, lechuga y carne de pollo	SELADIS
1	<i>Listeria spp</i>	Lechuga	SELADIS
4	<i>Proteus spp</i>	Lechuga y carne de pollo	SELADIS
2	<i>Pseudomona spp.</i>	lechuga y carne de pollo	SELADIS
1	<i>Salmonella spp</i>	carne de pollo	SELADIS
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	queso y carne de pollo	SELADIS
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	queso y carne de pollo	SELADIS
<b>Total de Cepas Nativas</b>			<b>30</b>

Fuente: Elaboración propia de las cepas del Laboratorio de SELADIS e INLASA

#### 9.4.2 Pruebas bioquímicas de identificación bacteriana

Posterior a la recuperación de las cepas objeto de estudio, se realizaron pruebas bioquímicas de identificación y confirmación microbiológica. (Véase Anexo 3)

#### 9.4.3 Cuantificación de la población bacteriana

Cada cepa bacteriana se sembró en 10 ml de caldo BHI, se incubó por 24 horas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ , hasta llegar a la fase estacionaria, a partir de este se realizaron diluciones seriadas 1/10, hasta llegar a la dilución  $1 \times 10^{-9}$ . Posteriormente se sembró tomó 1 ml de cada dilución en cajas Petri, vertiendo agar PCA, se incubó a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Posteriormente se realizó el recuento en placa para conocer el número de UFC/ml y realizar la posterior fortificación de las muestras de alimentos en concentración conocidas. (Véase Anexo 4)

#### 9.4.4 Búsqueda de matrices de queso y frutilla fresca libres del analito objeto de estudio

En función a los protocolos de la NB: 32014 y la NB: 32020 Ilustración 1 y 3, se procesaron aproximadamente 10 muestras de queso y frutilla fresca de diferente procedencia, hasta que se identificó matrices con una mínima contaminación bacteriana objeto de estudio; para su posterior fortificación en el proceso de verificación del desempeño del método alternativo.

#### Ilustración 5 Matrices libres de analitos objeto de estudio



Queso fresco procedente de la Industria EBA



Frutilla envasada procedente de supermercados Ketal

Fuente: Elaboración propia

#### **9.4.1 Parámetros de evaluación del desempeño de los métodos de cultivo microbiológico**

##### **9.4.1.1 Determinación de la inclusividad, para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli***

Para este objeto, se trabajó sin matriz alimentaria, se fortificaron 50 cepas (entre ATCC y nativas), pertenecientes a las enterobacterias y *Escherichia coli* (véase Tablas 3 y 4) en una concentración de 100 UFC/ml, procediendo con la marcha microbiológica según los métodos: de la NB:32014 y Petrifilm™ AOAC Official Method 2006.01 para el recuento de enterobacterias por otro lado NB:32005 y NB:32020 por placa Petrifilm™, para el recuento de *Escherichia coli*, paralelamente se realizó un tercer plaqueo en agar PCA, como control interno según lo establecido en la norma ISO 16140-2:2016.

##### **Análisis estadístico**

Se aplicó la fórmula del porcentaje de recuperación en los recuentos bacterianos obtenidos por ambos métodos de cultivo microbiológico.

$$\text{Recuperación}\% = \frac{\text{Recuento obtenido por el método alternativo}}{\text{Recuento obtenido por el método de referencia}} * 100$$

##### **9.4.1.2 Determinación de la exclusividad para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli***

Para este objeto se trabajó sin matriz alimentaria, fortificando 30 cepas, entre ATCC y nativas, no pertenecientes a enterobacterias ni *Escherichia coli* (véase Tablas 3 y 4) a una concentración de 100 UFC/ml, procediendo con la marcha microbiológica según los métodos NB: 32014: Petrifilm™ AOAC Official Method 2006.01 para el recuento de enterobacterias, también NB: 32005 y NB: 32020 por Petrifilm™ para el recuento de *Escherichia coli*.

### **Análisis estadístico**

Se aplicó la fórmula del porcentaje de inhibición de los recuentos bacterianos obtenidos por ambos métodos de cultivo microbiológico.

$$\text{Inhibición } \% = \frac{\text{Inhibición realizada por el método alternativo}}{\text{Inhibición realizada por el método de referencia}} * 100$$

#### **9.4.1.3 Límite de cuantificación**

Para este objeto se fortificaron 20 muestras de queso fresco y frutilla, con 20 UFC/g de *Escherichia coli* ATCC 10536 y 20 UFC de un pool de enterobacterias. El queso fresco se diluyó con agua peptonada y la frutilla con agua peptonada tamponada, después de homogenizar cada sobre en el equipo Stomacher-R400CPI, durante 30 s a 230 rpm, se tomó 1 ml de dilución, procediendo con la marcha microbiológica según los métodos analíticos objeto de evaluación. (Fornés, 2014, p. 8)

### **Análisis estadístico**

La Norma ISO 16140-2:2016 y AOAC; definen el LQ como la medida en que el Coeficiente de Variación (CV) del recuento microbiológico, debe ser inferior al 10% para validar el LQ establecido de 20 UFC/g (para un buen método de recuento microbiológico) ( $CV = DS/X < 10$ ); se analizó 20 muestras por categoría alimentaria para determinar el CV en función a los métodos objeto de evaluación. (Fornés, 2014, p. 12)

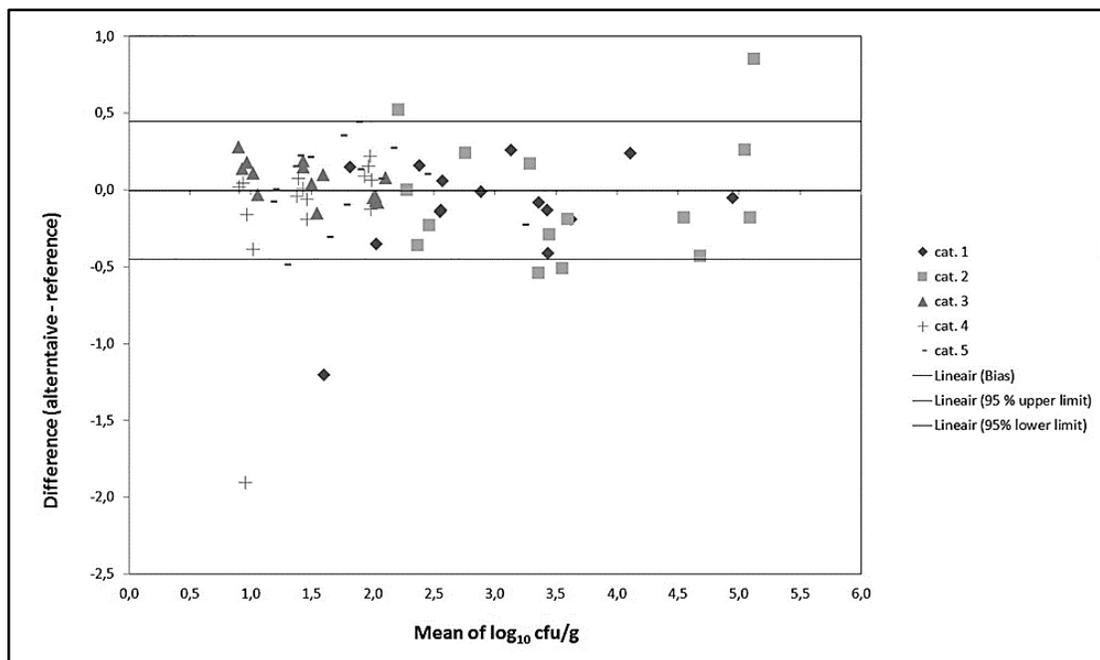
#### **9.4.1.4 Estudio de Veracidad Relativa**

Para este objeto, se tomaron 3 lotes diferentes por categoría alimentaria. El queso fresco se diluyó con agua peptonada y la frutilla con agua peptonada tamponada, se analizaron 5 muestras por lote, fortificándolas con una población bacteriana de  $8.0 \times 10^2$  UFC/g de *Escherichia coli* ATCC 10536 y  $8.0 \times 10^2$  UFC/g de un pool de enterobacterias, después de homogenizar las muestras en el equipo Stomacher-R400CPI, durante 30 s a 230 rpm, de cada sobre se tomó 1 ml de dilución, procediendo con la marcha microbiológica según los métodos analíticos objeto de evaluación.

## Cálculos estadísticos

Se transformaron los recuentos bacterianos a  $\log_{10}\text{UFC/g}$  para realizar los cálculos de correlación y regresión lineal para obtener la dispersión de datos del método de referencia frente al método alternativo por categoría alimentaria. Posteriormente, se aplicó el método de Bland-Altman para obtener un gráfico que permita comparar los métodos evaluados sobre las 2 categorías alimentaria y así verificar la confiabilidad y reproducibilidad para el uso previsto del método alternativo. En la Ilustración 6 se muestra los parámetros de este método estadístico, donde (bias o sesgo) cuantifica la diferencia media entre en método de referencia y alternativo, estableciendo Límites de Confianza (LC) superior e inferior a  $\pm 1,96$  sobre la media, donde se espera la inclusión del 95% de los resultados de las diferencias entre los métodos evaluados. (Martínez, 2017, p. 1)

### Ilustración 6 Gráfico de diferencias de Bland-Altman para diferentes categorías



Fuente: Obtenido de la norma UNE-EN ISO 16140-2, 2016, p. 20

#### 9.4.1.5 Estudio del Perfil de Precisión

Para este objeto, se tomó 1 lote por categoría alimentaria. El queso fresco se diluyó con agua peptonada y la frutilla con agua peptonada tamponada, se fortificó cada muestra con *Escherichia coli* ATCC 10536 y un pool de enterobacterias, ambos en 6 niveles de contaminación: en el nivel bajo ( $5,0 \times 10^1$  y  $1,0 \times 10^2$ ) UFC/g, nivel intermedio ( $2,0 \times 10^2$  y  $4,0 \times 10^2$ ) UFC/g y nivel alto ( $8,0 \times 10^2$  y  $1,6 \times 10^3$ ) UFC/g, procesando 5 réplicas por muestra, se homogenizó en el equipo Stomacher-R400CPI, durante 30 s a 230 rpm, de cada sobre se tomó 1 ml de dilución, procediendo con la marcha microbiológica según los métodos analíticos objeto de evaluación.

#### Análisis estadístico

Se transformaron los recuentos bacterianos a  $\log_{10}$  UFC/g, para realizar los cálculos se analizó la diferencia entre resultados del método alternativo y el método de referencia, definido por un Limite Aceptabilidad  $AL = 0,5$  unidades logarítmicas, determinado por el intervalo de tolerancia de expectativa  $\beta = 80\%$ <sup>2</sup> en el que caerá la proporción esperada de resultados futuros. (véase Ilustración 7 )

La Norma ISO 16140-2:2016 dispone una hoja de cálculo Excel® en: <http://Standards.iso.org/ISO/16140-2:2016>, para realizar los cálculos correspondientes a las ilustraciones y tablas establecidas por norma.

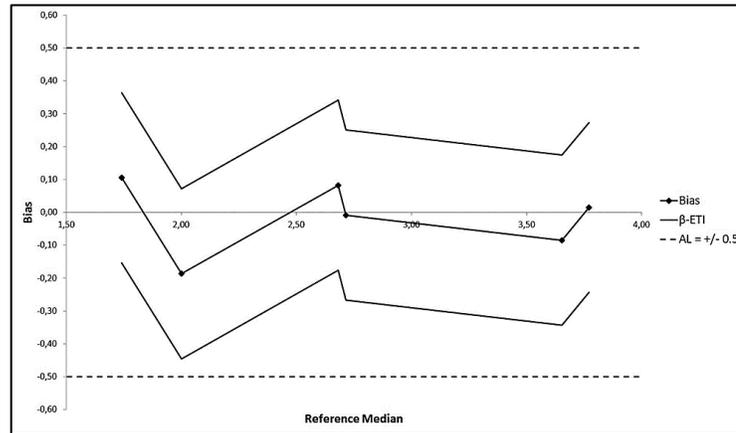
Los límites superior e inferior del intervalo de tolerancia están conectados por líneas rectas para interpolar el comportamiento de los límites entre los diferentes niveles de las muestras de verificación. (véase Ilustración 7 ) La línea horizontal media, representa los valores obtenidos con el método de referencia. Las diferencias entre los valores de referencia y del método alternativo, están representadas por puntos negros Bias o sesgo. Siempre que no existan diferencias significativas, estos valores recuperados se ubican sobre la línea de referencia horizontal. Los Límites de Aceptabilidad  $AL = \pm 0,5$  están

---

<sup>2</sup> Los  $\beta$ -ETI son los intervalos superior e inferior, en los que se espera que una proporción  $\beta$  de las mediciones futuras de diferentes elementos caigan dentro.

representados por dos líneas horizontales discontinuas y los límites de  $\beta$ -ETI superior e inferior, como líneas completas continuas. (UNE-EN ISO 16140-2, 2016, p. 23)

### **Ilustración 7 Perfil de precisión para una categoría de alimento en el estudio de comparación de métodos**



Fuente: (UNE-EN ISO 16140-2, 2016, p. 22)

#### **9.4.1.6 Análisis de muestras de queso fresco y frutilla de mercados populares de la ciudad de La Paz**

En las 15 muestras de alimento tomadas al azar se realizó el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli*, para analizar la relación con los resultados de los métodos de cultivo verificados.

Además, se hizo una comparación de los resultados en función a la normativa del (Reglamento Sanitario de Alimentos de DTO. N° 977/96 - Chile), en contraste con la norma local (NB: 33009: 2003), para evaluar la contaminación de enterobacterias y *Escherichia coli* en queso fresco y frutilla.

#### **9.5 Análisis estadístico**

Se realizó el análisis en función a los parámetros microbiológicos por categoría alimentaria de las Normas consultadas.

## 10. RESULTADOS

**Inclusividad:** La siguiente tabla muestra el recuento de la evaluación de cepas objeto de estudio a una concentración de 100 UFC/ml

**Tabla. 1 Recuperación de enterobacterias por los métodos de referencia y alternativo**

Nº	Enterobacterias	Método de referencia <sup>a</sup> UFC/ml	Método alternativo <sup>b</sup> UFC/ml	Recuento en PCA <sup>c</sup> UFC/ml
1	<i>Citrobacter spp.</i> (lechuga)	98	98	99
2	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	98	99	99
3	<i>Enterobacter spp.</i> (queso)	97	98	98
4	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	101	101	102
5	<i>Escherichia coli spp.</i> (pollo)	98	98	99
6	<i>Klebsiella spp.</i> (lechuga)	97	97	98
7	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	96	98	99
8	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	97	98	98
9	<i>Salmonella spp.</i> (pollo)	95	97	97
10	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	94	96	97
<b>PROMEDIO TOTAL</b>		<b>97,2</b>	<b>98,1</b>	<b>98,6</b>

Fuente: Elaboración propia de resultados de cultivo microbiológico en Laboratorio (véase Anexo 5)

<sup>a</sup> Agar rojo neutro cristal glucosa

<sup>b</sup> Placas Petrifilm™ para recuento de enterobacterias

<sup>c</sup> Agar de recuento en placa de aerobios mesófilos, usado como control de crecimiento bacteriano

Nota: Cada cepa microbiológica se procesó por cinco replicas, (véase Anexo 5)

### Porcentaje de recuperación de enterobacterias por el método alternativo

$$\text{Recuperación}\% = \frac{98,1}{97,2} * 100 = 100\%$$

La capacidad de recuperación de enterobacterias por las placas Petrifilm™ es del 100 %, evidenciando que no hay diferencia significativa en relación al método de referencia.

Inclusividad: La siguiente tabla muestra el recuento de la evaluación de cepas objeto de estudio a una concentración de 100 UFC/ml

**Tabla. 2 Recuperación de *Escherichia coli* por los métodos de referencia y alternativo**

N°	<i>Escherichia coli</i>	Método de referencia <sup>a</sup> UFC/ml	Método alternativo <sup>b</sup> UFC/ml	Recuento en PCA <sup>c</sup> UFC/ml
1	<i>Escherichia</i> ATCC 10536	96	97	97
2	<i>Escherichia coli</i> O:111	95	95	96
3	<i>Escherichia coli</i> O:145	99	98	99
4	<i>Escherichia coli</i> O:91	96	95	96
5	<i>Escherichia spp.</i> (frutilla)	93	92	95
6	<i>Escherichia spp.</i> (queso)	99	97	98
7	<i>Escherichia spp.</i> (lechuga)	98	97	99
8	<i>Escherichia spp.</i> (pollo)	95	95	95
<b>PROMEDIO TOTAL</b>		<b>96,3</b>	<b>95,9</b>	<b>96,7</b>

Fuente: Elaboración propia de resultados de cultivo microbiológico en Laboratorio (véase Anexo 6)

<sup>a</sup> Agar rojo neutro cristal lactosa

<sup>b</sup> Placas Petrifilm™ para recuento de *Escherichia coli*

<sup>c</sup> Agar de recuento en placa de aerobios mesófilos, usado como control de crecimiento bacteriano

Nota: Cada cepa microbiológica se procesó por siete replicas (véase Anexo 6)

#### **Porcentaje de recuperación de *Escherichia coli* por el método alternativo**

$$\text{Recuperación}\% = \frac{95,9}{96,3} * 100 = 99,5\%$$

La capacidad de recuperación de *Escherichia coli* por las placas Petrifilm™ es superior al 99%, evidenciando que no hay diferencia significativa en relación al método de referencia. También se resalta que el número de UFC de *E. coli* procedente de frutilla fue menor respecto a otras fuentes.

Exclusividad: La siguiente tabla muestra la evaluación de cepas no pertenecientes a la familia *enterobacteriaceae* por los métodos de referencia y alternativo

**Tabla. 3 Inhibición de bacterias diferentes a *enterobacteriaceae***

Enterobacterias	Método de referencia <sup>a</sup>	Método alternativo <sup>b</sup>	Recuento de 100 UFC/ml	
			Método de referencia <sup>a</sup> UFC/ml	Método alternativo <sup>b</sup> UFC/ml
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	Inhibido	Inhibido	0	0
<i>Bacillus cereus</i> spp. (cereales)	Inhibido	Inhibido	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	Inhibido	Inhibido	0	0
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	Inhibido	Inhibido	0	0
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 10145	Inhibido	Inhibido	0	0
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 10145 y cepas de (lechuga y carne de pollo)	Inhibido	Inhibido	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inhibido	Inhibido	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (queso y carne de pollo)	Inhibido	Inhibido	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Inhibido	Inhibido	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (queso y carne de pollo)	Inhibido	Inhibido	0	0
Recuento total obtenido			0	0
Porcentaje de Inhibición %			100	100

Fuente: Elaboración propia de resultados de cultivo microbiológico en Laboratorio (véase Anexo 7)

<sup>a</sup> Agar rojo neutro cristal glucosa

<sup>b</sup> Placas Petrifilm™ para recuento de enterobacterias

### Porcentaje de inhibición de bacterias diferentes a enterobacterias

$$\text{Inhibición\%} = \frac{100}{100} * 100 = 100\%$$

La capacidad de inhibición de bacterias diferentes a enterobacterias por las placas Petrifilm™ es del 100 %, al igual que el método de referencia.

Exclusividad: La siguiente tabla muestra la evaluación de cepas pertenecientes a enterobacterias y otras especies diferentes a *Escherichia coli* por los métodos de referencia y alternativo

**Tabla. 4 Inhibición de bacterias diferentes a *Escherichia coli***

Microorganismo	Crecimiento en medios evaluados	Crecimiento de <i>E. coli</i> <sup>a</sup>	Método de referencia UFC/ml <sup>b</sup>	Método alternativo UFC/ml <sup>c</sup>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	Inhibido	Negativo	0	0
<i>Bacillus spp.</i> (cereales)	Inhibido	Negativo	0	0
<i>Citrobacter</i> (frutilla, queso, lechuga y carne de pollo)	colonias rojas	Negativo	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	colonias rojas	Negativo	0	0
<i>Enterobacter spp.</i> (queso, lechuga)	colonias rojas	Negativo	0	0
<i>Klebsiella spp.</i> (queso, lechuga y carne de pollo)	colonias rojas	Negativo	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	Inhibido	Negativo	0	0
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	Inhibido	Negativo	0	0
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	colonias rojas	Negativo	0	0
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 10145	Inhibido	Negativo	0	0
<i>Pseudomona spp.</i> lechuga y carne de pollo	Inhibido	Negativo	0	0
<i>Salmonella spp.</i> (carne de pollo)	colonias rojas	Negativo	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	colonias rojas	Negativo	0	0
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	colonias rojas	Negativo	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inhibido	Negativo	0	0
<i>Staphylococcus aureus spp.</i>	Inhibido	Negativo	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Inhibido	Negativo	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis spp.</i> (queso y carne de pollo)	Inhibido	Negativo	0	0
Recuento total obtenido			<b>0</b>	<b>0</b>
Porcentaje de Inhibición %			100	100

Fuente: Elaboración propia de resultados de cultivo microbiológico en Laboratorio (véase Anexo 8)

<sup>a</sup> Crecimiento de colonias azules en placas Petrifilm™ y/o colonias no típicas en recuento en agar

<sup>a</sup> Agar rojo neutro cristal lactosa

<sup>b</sup> Placas Petrifilm™ para recuento de *Escherichia coli*

#### Porcentaje de inhibición de bacterias diferentes a *Escherichia coli*

$$\text{Inhibición\%} = \frac{100}{100} * 100 = 100 \%$$

Ambos medios de cultivo inhibieron el 100% de cepas diferentes a enterobacterias y dentro de este grupo ninguna mostró características típicas de *Escherichia coli*

La siguiente tabla muestra el Coeficiente de Variación del recuento de 20 muestras analizadas por categoría alimentaria

**Tabla. 5 Límite de Cuantificación para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli* por el método de referencia y alternativo**

Parámetro microbiológico evaluado	Alimento analizado	Método evaluado	CV de las muestras analizadas	Comparación del CV práctico y teórico	Aceptación* del LQ de 20 UFC/mg
<b>Recuento de Enterobacterias</b>	Queso	Método de referencia	10%	10%=10%	SI
		Método alternativo	10%	10%=10%	SI
	Frutilla	Método de referencia	26,2%	26,2%>10%	NO
		Método alternativo	36,2%	36,2%>10%	NO
<b>Recuento de <i>Escherichia coli</i></b>	Queso	Método de referencia	10%	10%=10%	SI
		Método alternativo	11,7%	11,7%>10%	NO
	Frutilla	Método de referencia	26,5%	26,5%>10%	NO
		Método alternativo	37%	37%>10%	NO

Fuente: Elaboración propia de resultados de cultivo microbiológico en Laboratorio (véase Anexo 9)

\*Criterio de aceptación:  $CV \leq 10\%$  = el método evaluado recupera 20 UFC/g de cepas objeto de estudio

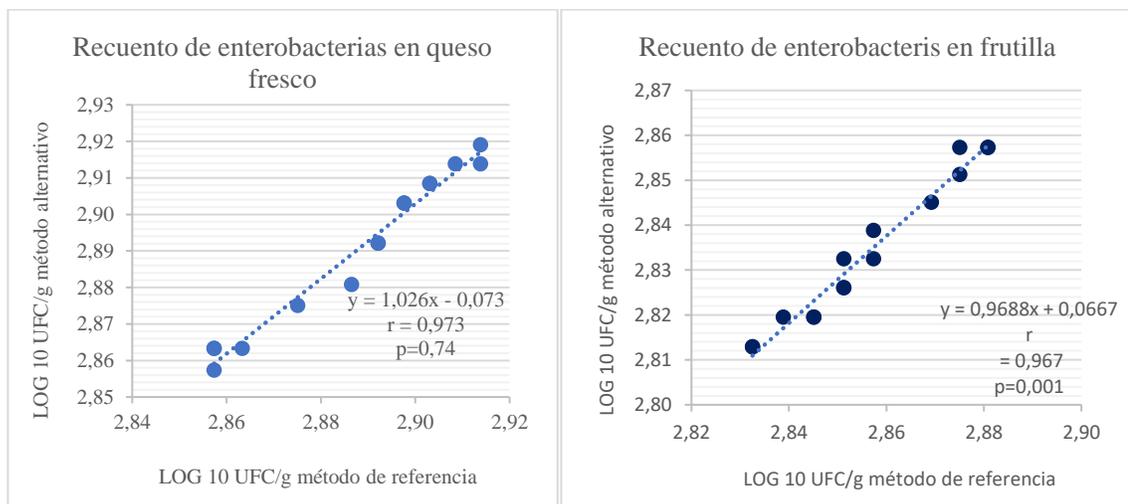
Nota: Según la Norma ISO 16140-2:2016 y AOAC; para validar el LQ establecido por el laboratorio, el Coeficiente de Variación (CV) del recuento microbiológico, debe ser igual o inferior al 10%.

Los resultados de 20 muestras analizadas por categoría alimentaria se muestran en el (véase Anexo 9)

### 10.3 ESTUDIO DE VERACIDAD RELATIVA

La siguiente ilustración evidencia el grado de relación lineal e igualdad estadística entre los métodos evaluados en queso fresco (0,97) y ( $p=0,74$ ), en frutilla (0,97) y ( $p= 0,001$ ) respectivamente.

**Ilustración. 1 Relación lineal del método de referencia frente al método alternativo, para el recuento de enterobacterias, por categoría alimentaria.**

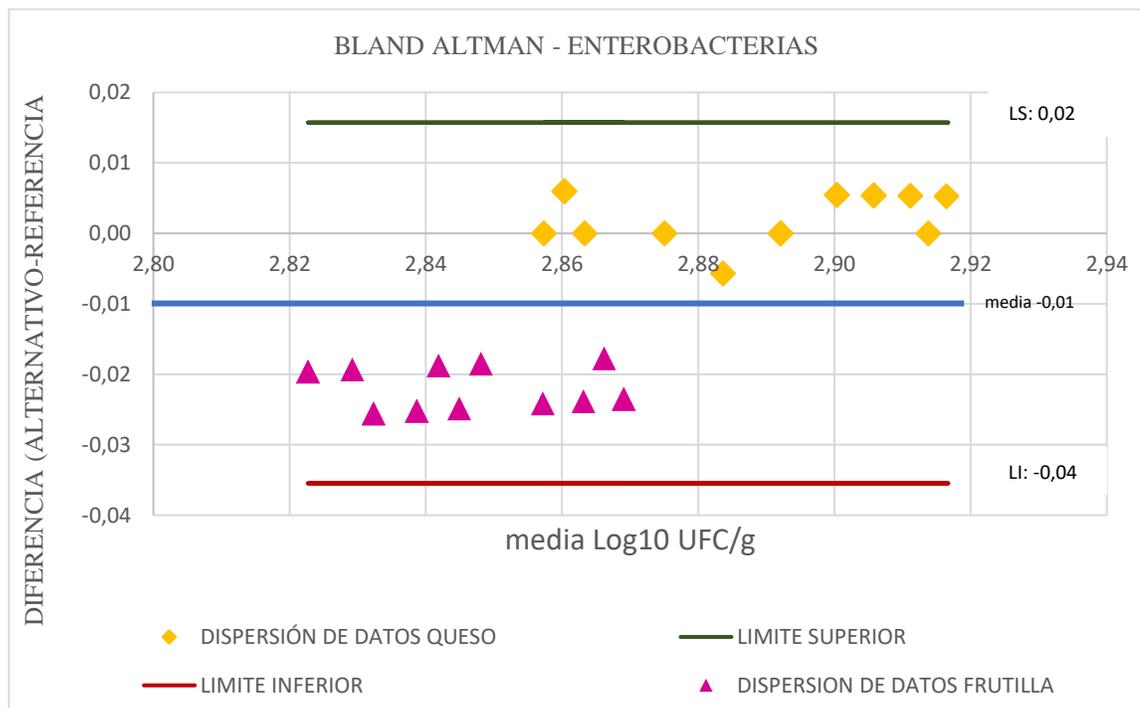


Fuente: Elaboración propia, en base a resultados de laboratorio y el programa Excel

Nota:  $p > 0,05$  significa que el desempeño entre los métodos evaluados, es estadísticamente igual y  $p < 0,05$  el desempeño entre los métodos evaluados es estadísticamente diferente.

La siguiente ilustración muestra que el 100% de dispersión de datos de los métodos evaluados en ambas categorías alimentarias se encuentran dentro de los límites de confianza aceptables límite superior: Log de 0,02 y límite inferior: Log -0,04.

**Ilustración. 2 Recuento de enterobacterias en queso fresco y frutilla, en relación al Límite de Confianza de la Diferencia de Bland-Altman**

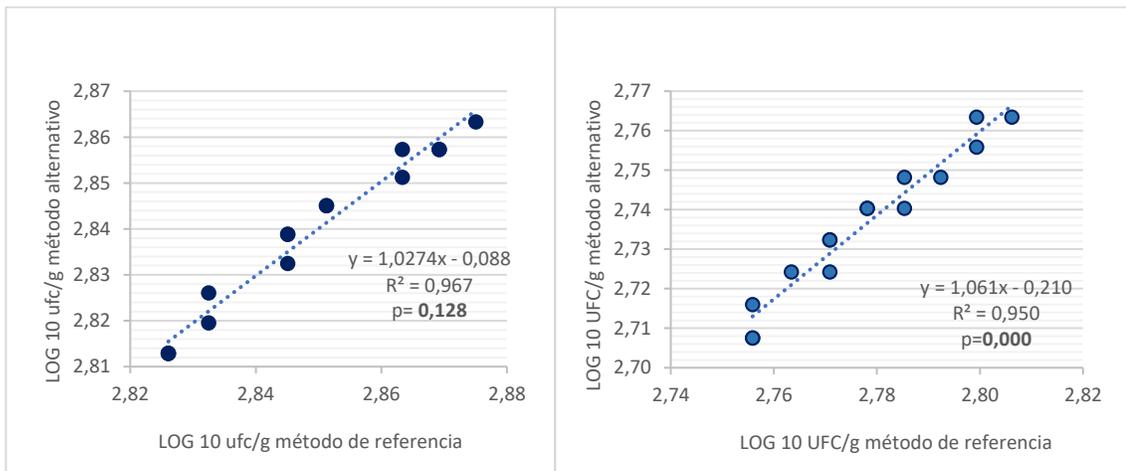


Fuente: Elaboración propia, en base a resultados de laboratorio y el programa Excel

Nota: Existe sesgo entre los métodos evaluados en función al tipo de matriz, evidenciándose un recuento en queso fresco sobre la línea media (log -0,01) y en la frutilla un recuento por debajo de la media.

La siguiente ilustración evidencia el grado de relación lineal e igualdad estadística entre los métodos evaluados en queso fresco (0,97) y (p=0,128), en frutilla (0,95) y (p= 0,000) respectivamente.

**Ilustración 3 Relación lineal del método de referencia frente al método alternativo, para el recuento de *Escherichia coli*, por categoría alimentaria.**

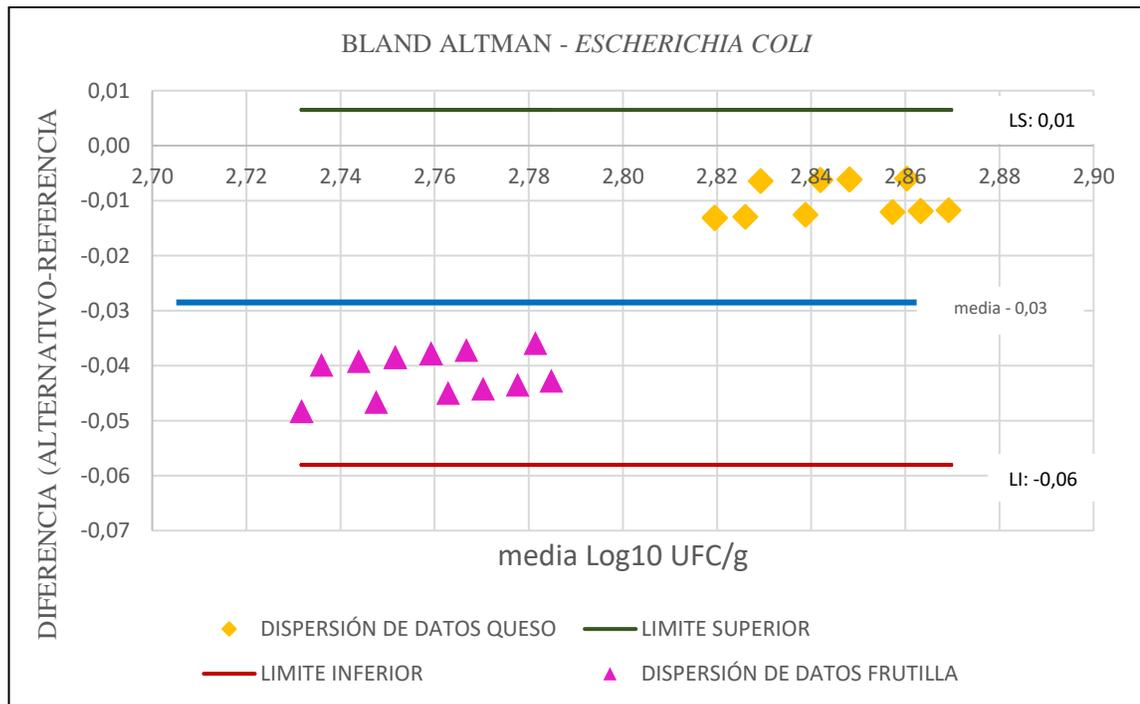


Fuente: Elaboración propia, en base a resultados de laboratorio y el programa Excel

Nota:  $p > 0,05$  significa que el desempeño entre los métodos evaluados, es estadísticamente igual y  $p < 0,05$  el desempeño entre los métodos evaluados es estadísticamente diferente.

La siguiente ilustración muestra que el 100% de dispersión de datos en los métodos evaluados en ambas categorías alimentarias se encuentran dentro de los límites de confianza aceptables: Límite superior: Log de 0,01 y Límite inferior: Log -0,06.

**Ilustración 4 Recuento de *Escherichia coli* en queso fresco y frutilla, en relación al Límite de Confianza de la Diferencia de Bland-Altman**



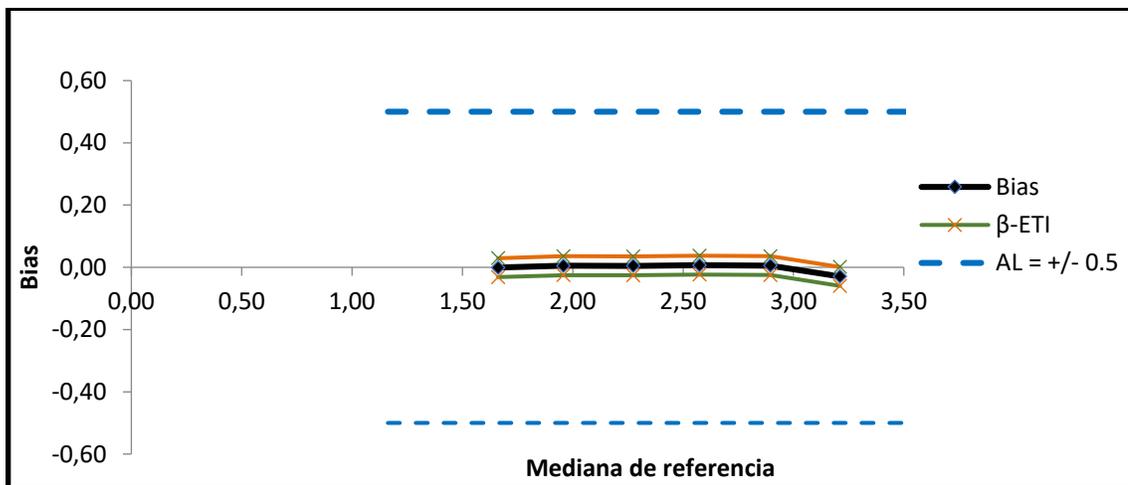
Fuente: Elaboración propia, en base a resultados de laboratorio y el programa Excel

Nota: Existe sesgo entre los métodos evaluados en función al tipo de matriz, evidenciándose en queso fresco un recuento sobre la línea media (log -0,03) y en la frutilla, un recuento por debajo de la media, sin embargo ambos grupos tienen un recuento inferior al esperado.

## 10.4 ESTUDIO DE PERFIL DE PRECISIÓN

La siguiente ilustración muestra que: de los 6 niveles de contaminación microbiológica comprendidos entre  $5,0 \times 10^1$  a  $1,6 \times 10^3$  UFC/g, el perfil de precisión y la repetibilidad de los resultados están dentro de los límites de aceptabilidad fijados en  $\beta\text{-ETI} \pm 0,5$  log UFC y  $\leq 0.125$  para ambos métodos evaluados.

**Ilustración 5 Perfil de precisión del método alternativo para recuento de enterobacterias en queso fresco, en función a intervalos de aceptabilidad de tolerancia de expectativa  $\beta\text{-ETI}$**



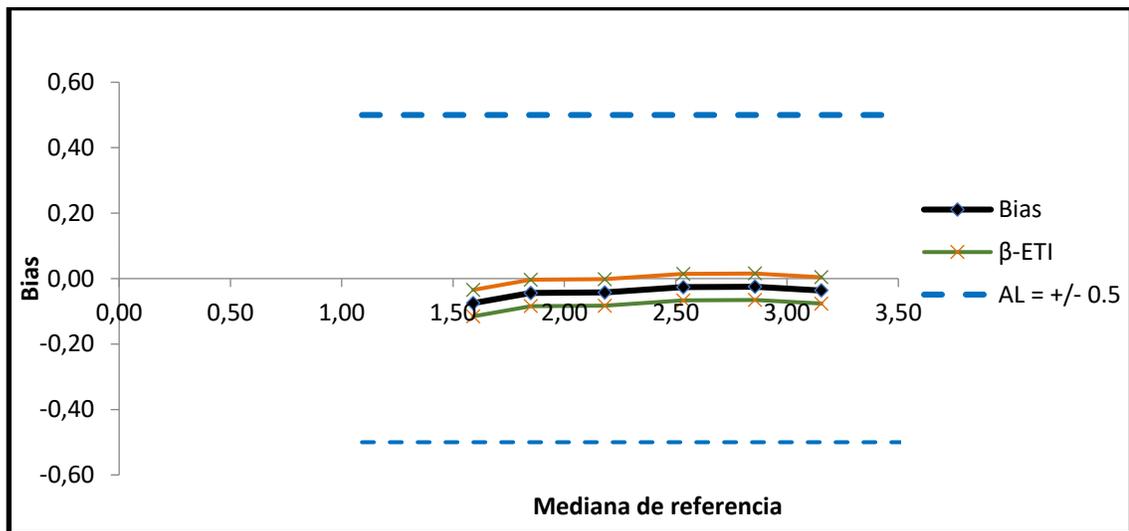
Nivel de contaminación	Nivel de recuento teórico UFC/gr	Valor central de referencia	Sesgo	$\beta\text{-ETI}$ inferior	$\beta\text{-ETI}$ superior	Límite de Aceptabilidad $\beta\text{-ETI}(i) > -0,5$ Aceptable	Límite de Aceptabilidad $\beta\text{-ETI}(s) < +0,5$ Aceptable
Bajo	$5,0 \times 10^1$	1,66	-0,001	-0,031	0,029	SI	SI
Bajo	$1,0 \times 10^2$	1,96	0,005	-0,025	0,036	SI	SI
intermedio	$2,0 \times 10^2$	2,27	0,005	-0,026	0,035	SI	SI
intermedio	$4,0 \times 10^2$	2,58	0,007	-0,023	0,037	SI	SI
Alto	$8,0 \times 10^2$	2,90	0,005	-0,025	0,036	SI	SI
Alto	$1,6 \times 10^3$	3,21	<b>-0,029</b>	<b>-0,060</b>	0,001	SI	SI
	Método de referencia	Método alternativo	SD repetibilidad del método de referencia $\leq 0.125$	Límite de Aceptabilidad final			
SD Repetibilidad	0,020	0,021	SI	+/-	0,500		

Fuente: los cálculos se realizaron utilizando la herramienta AP MSC (cláusula 6-1-3-3) versión 31-07-2018 disponible en <http://Standards.iso.org/iso/16140-2:2016>

Nota: Se resalta un mayor sesgo en los resultados del último nivel de contaminación.

La siguiente ilustración muestra que: de los 6 niveles de contaminación microbiológica comprendidos entre  $5,0 \times 10^1$  a  $1,6 \times 10^3$  UFC/g, el perfil de precisión y la repetibilidad de los resultados están dentro de los límites de aceptabilidad fijados en  $\beta\text{-ETI} \pm 0,5$  log UFC y  $\leq 0.125$  para ambos métodos evaluados.

**Ilustración 6 Perfil de precisión del método alternativo para recuento de enterobacterias en frutilla, en función a intervalos de aceptabilidad de tolerancia de expectativa  $\beta\text{-ETI}$**



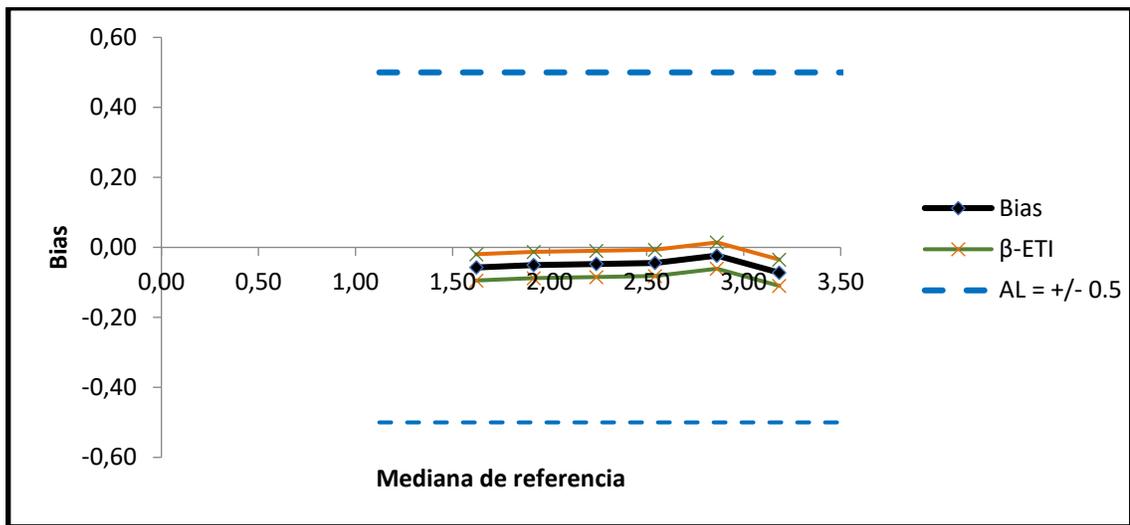
Nivel de contaminación	Nivel de recuento teórico UFC/gr	Valor central de referencia	Sesgo	$\beta\text{-ETI}$ inferior	$\beta\text{-ETI}$ superior	Límite de Aceptabilidad $\beta\text{-ETI}(i) > -0,5$ Aceptable	Límite de Aceptabilidad $\beta\text{-ETI}(s) < +0,5$ Aceptable
Bajo	$5,0 \times 10^1$	1,59	-0,075	<b>-0,115</b>	-0,035	SI	SI
Bajo	$1,0 \times 10^2$	1,85	-0,044	-0,084	-0,003	SI	SI
intermedio	$2,0 \times 10^2$	2,18	-0,042	-0,083	-0,002	SI	SI
intermedio	$4,0 \times 10^2$	2,53	-0,026	-0,067	0,014	SI	SI
Alto	$8,0 \times 10^2$	2,86	-0,025	-0,065	0,016	SI	SI
Alto	$1,6 \times 10^3$	3,15	-0,036	-0,077	0,004	SI	SI
	Método de referencia		Método alternativo	SD repetibilidad del método de referencia $\leq 0.125$		Límite de Aceptabilidad final	
SD Repetibilidad	0,023		0,028	SI		+/-	0,500

Fuente: los cálculos se realizaron utilizando la herramienta AP MSC (cláusula 6-1-3-3) versión 31-07-2018 disponible en <http://Standards.iso.org/iso/16140-2:2016>

Nota: Se resalta un mayor sesgo en los resultados del primer nivel de contaminación.

La siguiente ilustración muestra que: de los 6 niveles de contaminación microbiológica comprendidos entre  $5,0 \times 10^1$  a  $1,6 \times 10^3$  UFC/g, el perfil de precisión y la repetibilidad de los resultados están dentro de los límites de aceptabilidad fijados en  $\beta$ -ETI  $\pm 0,5$  log UFC y  $\leq 0.125$  para ambos métodos evaluados.

**Ilustración 7 Perfil de precisión del método alternativo para recuento de *Escherichia coli* en queso fresco, en función a intervalos de aceptabilidad de tolerancia de expectativa  $\beta$ -ETI**



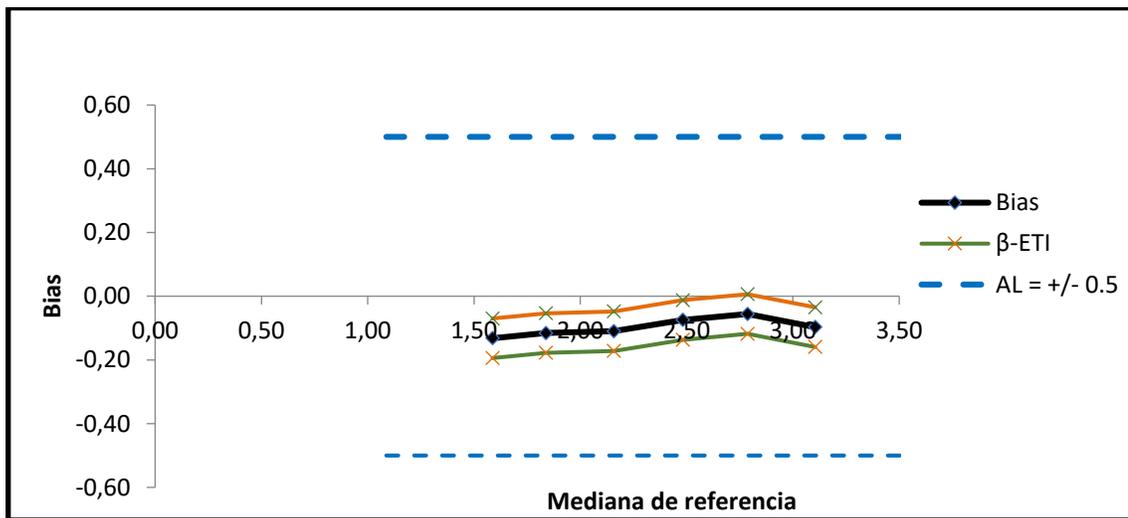
Nivel de contaminación	Nivel de recuento teórico UFC/gr	Valor central de referencia	Sesgo	$\beta$ -ETI inferior	$\beta$ -ETI superior	Límite de Aceptabilidad $\beta$ -ETI(i) $> -0,5$ Aceptable	Límite de Aceptabilidad $\beta$ -ETI(s) $< +0,5$ Aceptable
Bajo	$5,0 \times 10^1$	1,62	-0,057	-0,095	-0,020	SI	SI
Bajo	$1,0 \times 10^2$	1,92	-0,050	-0,088	-0,013	SI	SI
intermedio	$2,0 \times 10^2$	2,24	-0,047	-0,085	-0,010	SI	SI
intermedio	$4,0 \times 10^2$	2,54	-0,044	-0,082	-0,007	SI	SI
Alto	$8,0 \times 10^2$	2,86	-0,023	-0,061	0,014	SI	SI
Alto	$1,6 \times 10^3$	3,18	<b>-0,072</b>	<b>-0,110</b>	-0,035	SI	SI
	Método de referencia	Método alternativo	SD repetibilidad del método de referencia $\leq 0.125$		Límite de Aceptabilidad final		
SD Repetibilidad	0,016	0,026	YES		+/-	0,500	

Fuente: cálculos se realizaron utilizando la herramienta AP MSC (cláusula 6-1-3-3) versión 31-07-2018 disponible en <http://Standards.iso.org/iso/16140-2:2016>

Nota: Se resalta un mayor sesgo en los resultados del último nivel de contaminación.

La siguiente ilustración muestra que: de los 6 niveles de contaminación microbiológica comprendidos entre  $5,0 \times 10^1$  a  $1,6 \times 10^3$  UFC/g, el perfil de precisión y la repetibilidad de los resultados están dentro de los límites de aceptabilidad fijados en  $\beta\text{-ETI} \pm 0,5$  log UFC y  $\leq 0.125$  para ambos métodos evaluados.

**Ilustración 8 Perfil de precisión del método alternativo para recuento de *Escherichia coli* en frutilla, en función a intervalos de aceptabilidad de tolerancia de expectativa  $\beta\text{-ETI}$**



Nivel de contaminación	Nivel de recuento teórico UFC/gr	Valor central de referencia	Sesgo	$\beta\text{-ETI}$ inferior	$\beta\text{-ETI}$ superior	Límite de Aceptabilidad $\beta\text{-ETI}(i) > -0,5$ Aceptable	Límite de Aceptabilidad $\beta\text{-ETI}(s) < +0,5$ Aceptable
Bajo	$5,0 \times 10^1$	1,59	<b>-0,132</b>	<b>-0,194</b>	-0,070	SI	SI
Bajo	$1,0 \times 10^2$	1,84	-0,116	-0,178	-0,054	SI	SI
intermedio	$2,0 \times 10^2$	2,16	-0,110	-0,172	-0,048	SI	SI
intermedio	$4,0 \times 10^2$	2,48	-0,075	-0,137	-0,013	SI	SI
Alto	$8,0 \times 10^2$	2,79	-0,056	-0,118	0,006	SI	SI
Alto	$1,6 \times 10^3$	3,10	-0,097	-0,159	-0,035	SI	SI
	Método de referencia	Método alternativo	SD repetibilidad del método de referencia $\leq 0.125$		Límite de Aceptabilidad final		
SD Repetibilidad	0,029	0,043	SI		+/-	0,500	

Fuente: los cálculos se realizaron utilizando la herramienta AP MSC (cláusula 6-1-3-3) versión 31-07-2018 disponible en <http://Standards.iso.org/iso/16140-2:2016>

Nota: Se resalta un mayor sesgo en los resultados del primer nivel de contaminación, así también los recuentos están por debajo del valor de referencia central.

## ANÁLISIS DE MUESTRAS TOMADAS DE MERCADOS POPULARES DE LA CIUDAD DE LA PAZ

Las muestras de queso fresco se analizaron aplicando los métodos evaluados, bajo requisitos y parámetros de la Norma Boliviana (NB) y Norma Chilena (NCh), se evidencia recuento fuera de norma en 12 muestras según la NB y 15 muestras según la NCh.

**Tabla 6 Recuento de enterobacterias y *Escherichia coli*, en 15 muestras de queso fresco, procedentes de 5 mercados populares de la ciudad de La Paz**

N°	Queso procedente del mercado	Método de referencia		Método alternativo	
		Recuento de enterobacterias UFC/g	Recuento de <i>E. coli</i> UFC/g	Recuento de enterobacterias UFC/g	Recuento de <i>E. coli</i> UFC/g
1	Tejar	3,8 x10 <sup>4</sup> *	7,5 x10 <sup>1</sup> *	4,0 x10 <sup>4</sup> *	6,0 x10 <sup>1</sup> *
2	Tejar	9,4 x10 <sup>5</sup> *	9,5 x10 <sup>1</sup> *	9,4 x10 <sup>5</sup> *	8,0 x10 <sup>1</sup> *
3	Tejar	9,7 x10 <sup>3</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup>	1,0 x10 <sup>4</sup> *	<1,0 x10 <sup>1</sup>
4	Rodríguez	2,0 x10 <sup>6</sup> *	1,1 x10 <sup>2</sup> *	1,5 x10 <sup>6</sup> *	9,5 x10 <sup>1</sup> *
5	Rodríguez	3,4 x10 <sup>5</sup> *	8,5 x10 <sup>1</sup> *	3,7 x10 <sup>5</sup> *	7,0 x10 <sup>1</sup> *
6	Rodríguez	1,1 x10 <sup>4</sup> *	<1,0 x10 <sup>1</sup>	1,2 x10 <sup>4</sup> *	<1,0 x10 <sup>1</sup>
7	Lanza	4,7 x10 <sup>5</sup> *	1,5 x10 <sup>2</sup> *	4,8 x10 <sup>5</sup> *	1,0 x10 <sup>2</sup> *
8	Lanza	1,2 x10 <sup>6</sup> *	9,5 x10 <sup>1</sup> *	9,9 x10 <sup>5</sup> *	7,5 x10 <sup>1</sup> *
9	Lanza	1,2 x10 <sup>4</sup> *	1,0 x10 <sup>1</sup> *	1,5 x10 <sup>4</sup> *	1,0 x10 <sup>1</sup> *
10	Camacho	9,8 x10 <sup>3</sup>	1,0 x10 <sup>1</sup> *	1,1 x10 <sup>4</sup> *	1,0 x10 <sup>1</sup> *
11	Camacho	<1,0 x10 <sup>3</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup>	1,0 x10 <sup>3</sup> *	<1,0 x10 <sup>1</sup>
12	Camacho	3,8 x10 <sup>3</sup>	1,0 x10 <sup>1</sup> *	4,0 x10 <sup>3</sup>	1,0 x10 <sup>1</sup> *
13	Chasqui pampa	9,1 x10 <sup>4</sup> *	5,5 x10 <sup>1</sup> *	9,6 x10 <sup>4</sup> *	3,0 x10 <sup>1</sup> *
14	Chasqui pampa	1,0 x10 <sup>6</sup> *	1,8 x10 <sup>1</sup> *	9,8 x10 <sup>5</sup> *	1,4 x10 <sup>2</sup> *
15	Chasqui pampa	9,9 x10 <sup>3</sup>	1,0 x10 <sup>1</sup> *	1,2 x10 <sup>4</sup> *	1,0 x10 <sup>1</sup> *

(\*) Muestras con recuentos fuera de norma

<1,0 x10<sup>3</sup> UFC/g = Ausencia de crecimiento en la mínima dilución usada

<1,0 x10<sup>1</sup> = Ausencia de crecimiento en la mínima dilución usada o igual a 0 UFC/gr

M: Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable

Norma Chilena: Enterobacterias M≥1,0x10<sup>4</sup> UFC/g; *Escherichia coli* M≥1,0 x10<sup>1</sup> UFC/g

Norma Boliviana: Enterobacterias (sin valores); *Escherichia coli* M≥1,0 x10<sup>1</sup> UFC/g

**Tabla 7 Recuento de enterobacterias y *Escherichia coli*, en 15 muestras de frutilla, procedentes de 5 mercados populares de la ciudad de La Paz**

Las muestras se analizaron comparando los métodos evaluados, bajo los requisitos y parámetros de la Norma Chilena (NCh) al no existir Normativa Boliviana para esta categoría alimentaria. Se evidenció contaminación fuera de norma de la frutilla en: 4 muestras por el método de referencia y 3 por el método alternativo

N°	Frutilla del mercado	Método de referencia		Método alternativo	
		Recuento de enterobacterias UFC/g	Recuento de <i>E. coli</i> UFC/g	Recuento de enterobacterias UFC/g	Recuento de <i>E. coli</i> UFC/g
1	Tejar	1,3 x10 <sup>5</sup>	1,0 x10 <sup>1</sup>	9,9 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g
2	Tejar	6,0 x10 <sup>4</sup>	1,2 x10 <sup>1</sup>	5,0 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g
3	Tejar	<1,0 x10 <sup>4</sup>	1,0 x10 <sup>1</sup>	<1,0 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g
4	Rodríguez	1,4 x10 <sup>6*</sup>	1,5 x10 <sup>2</sup> *	9,9 x10 <sup>5</sup> *	9,0 x10 <sup>1</sup>
5	Rodríguez	<1,0 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g	<1,0 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g
6	Rodríguez	2,5 x10 <sup>4</sup>	1,5 x10 <sup>1</sup>	1,0 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g
7	Lanza	2,3 x10 <sup>6</sup> *	8,0 x10 <sup>1</sup>	1,6 x10 <sup>6</sup> *	4,5 x10 <sup>1</sup>
8	Lanza	<1,0 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g	<1,0 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g
9	Lanza	6,0 x10 <sup>5</sup> *	1,1 x10 <sup>2</sup> *	4,9 x10 <sup>5</sup>	8,9 x10 <sup>1</sup>
10	Camacho	1,0 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g	<1,0 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g
11	Camacho	1,5 x10 <sup>4</sup>	2,0 x10 <sup>1</sup>	<1,0 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g
12	Camacho	8,3 x10 <sup>5*</sup>	4,0 x10 <sup>2</sup> *	7,9 x10 <sup>5</sup> *	2,5x10 <sup>2</sup> *
13	Chasqui pampa	1,0 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g	<1,0 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g
14	Chasqui pampa	1,0 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g	<1,0 x10 <sup>4</sup>	<1,0 x10 <sup>1</sup> UFC/g
15	Chasqui pampa	8,5 x10 <sup>4</sup>	2,5 x10 <sup>1</sup>	7,5 x10 <sup>4</sup>	1,4 x10 <sup>1</sup>

(\*) Muestras con recuentos fuera de norma

<1,0 x10<sup>4</sup> UFC/g: Ausencia de crecimiento en la mínima dilución usada

<1,0 x10<sup>1</sup> UFC/g: Ausencia de crecimiento en la mínima dilución usada

M: Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable

Norma Chilena: Enterobacterias M≥5,0 x10<sup>5</sup> UFC/g; *Escherichia coli* M≥1,0 x10<sup>2</sup> UFC/g

Norma Boliviana: Enterobacterias (sin valores); *Escherichia coli* (sin valores)

## 11. DISCUSIÓN

### 11.1 Inclusividad aplicando el método de referencia y las placas Petrifilm™ para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli*

La capacidad de recuperación de enterobacterias y *Escherichia coli* por las placas Petrifilm™ fue superior al 99%, estos resultados concuerdan con los datos bibliográficos de la guía de las placas Petrifilm™ (2009), donde se comparó el método de agar MRS para la recuperación de bacterias ácido-lácticas en 161 productos alimenticios. El método Petrifilm™ identificó el 99% de la producción de gas de bacterias hetero fermentadora obligado y facultativo, a comparación del 80% de identificación por el método de referencia. (Petrifilm™, 2009, p.64)

En el análisis individual del crecimiento de enterobacterias en las placas Petrifilm™, se observó un mejor y mayor recuento de *Proteus spp.*, a diferencia de su recuento en agar; podría deberse a que este microorganismo crece en oleada, generando una sobreposición bacteriana y características fenotípicas que limitan su recuento sobre el agar, (Elmer Koneman , 2006, p. 231) en cambio, las placas Petrifilm™, tienen una superficie sólida y membrana superior que fijan la muestra sembrada; limitando el desplazamiento y sobreposición bacteriana sobre el medio de cultivo. (Petrifilm 3M, 2009, p.5)

También se evidenció un mejor recuento de *Shigella spp.*, en las placas Petrifilm™, coincidiendo con Apaza y Beuchat (2016). Las placas tienen el indicador de color 2,3,5 triclورو de trifeniltetrazolio y rojo de clorofenol (TTC); mejora la sensibilidad del recuento de enterobacterias a comparación del método de referencia, cuyo indicador microbiológico es el rojo neutro.

La recuperación de *Escherichia coli*, procedente de frutilla fue menor, en relación a otras matrices, esto debido a las características intrínsecas de la frutilla, como el pH ácido y composición nutricional, que lesionan y limitan respectivamente el crecimiento bacteriano, es importante mencionar que las placas Petrifilm™ tienen dos indicadores de color; 5-bromo-4-cloro-3-indolilbeta-D-glucurónido (BCIG) y triclورو de trifenil

tetrazolio (o TTC); significando una ventaja al aumentar la sensibilidad de *E. coli*, pero también una desventaja en la recuperación de las células lesionadas, donde sería necesario realizar un pre enriquecimiento en las muestras que hayan sufrido diferentes tratamientos.

### **11.2 Exclusividad aplicando el método de referencia y las placas Petrifilm™, para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli***

Las placas Petrifilm™ inhibió el recuento de enterobacterias en 100% de los microorganismos Gram (+), en el recuento de *Escherichia coli*, se pudo evidenciar que las enterobacterias y dentro de ellas coliformes fermentadoras de lactosa diferentes a *E. coli* crecieron en los medios de cultivo, pero no del color azul esperado lo que también se expone en la guía de medios del fabricante, dando a notar que este medio es altamente diferencial y no así selectivo de la familia *Enterobacteriaceae*.

### **11.3 Límite de Cuantificación para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli* por el método de referencia y alternativo**

Las placas Petrifilm™ tienen la capacidad de recuperar enterobacterias en queso fresco a partir de 20 UFC/g. Este alimento tiene un pH cercano a la neutralidad y contenido nutricional que promueve la recuperación mínima bacteriana, a diferencia de la frutilla cuyo pH ácido, significa una limitante de crecimiento bacteriano. Las placas Petrifilm™ para recuento de *E. coli* no tienen la capacidad para cuantificar 20 UFC/g en las matrices analizadas. Si bien esto es una limitante respecto al método alternativo, en función al alimento no significa un problema porque los niveles de contaminación de la frutilla y queso no permisibles según normativa Nacional e Internacional, son mayores a 20 UFC/g respectivamente. Sin embargo, el riesgo de mezclar la frutilla con otros alimentos cuyas características intrínsecas sean óptimas promoverán el crecimiento de bajas concentraciones microbiológicas.

### **11.4 Relación lineal del método de referencia frente al método alternativo, para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli***

Los resultados del recuento de enterobacterias y *Escherichia coli* en queso fresco y frutilla, por los métodos evaluados, mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de la frutilla versus el queso fresco, coincidiendo estos con el trabajo de Ávila

donde se mostraron diferencias estadísticamente significativas, entre los resultados del análisis microbiológico de la crema de leche de pH neutro y el jugo de naranja de pH inferior a 5, siendo el pH del alimento un factor influyente en el desempeño de las placas Petrifilm™. (Ávila, 2021, p.1)

### **11.5 Perfil de precisión del método alternativo para recuento de enterobacterias y *Escherichia coli* en queso fresco y frutilla, en función a intervalos de aceptabilidad de tolerancia de expectativa $\beta$ -ETI**

Los resultados de los 6 niveles evaluados por las placas Petrifilm, evidencian mayor sesgo en el recuento de enterobacterias y *E. coli* en el último nivel para el queso fresco y el primer nivel en frutilla; esto coincide con el trabajo de Ramírez, que demuestra mayor diferencia estadística en los recuentos bacterianos en los niveles de  $\leq 1 \times 10^1$  UFC/g y  $> 1,6 \times 10^2$  UFC/g en las placas Petrifilm™ debido a que la superficie de las placas Petrifilm™ es de 20 cm<sup>3</sup> y de las cajas petri 60 cm<sup>3</sup>, siendo una limitante para las placas en el recuento de poblaciones elevadas y en el segundo caso, porque se había demostrado que el recuento microbiológico en la frutilla tiene menor sensibilidad. (Ramírez, 2017, p. 2),

### **11.6 Recuento de enterobacterias y *Escherichia coli*, en 15 muestras de queso fresco y frutilla, procedentes de 5 mercados populares de la ciudad de La Paz**

En la comparación de resultados del análisis del queso fresco según la Norma Boliviana y el Reglamento Sanitario Chileno, existe una diferencia de 3 muestras con valores bacterianos fuera de Norma, misma que contemplaba el análisis de enterobacterias, en este sentido podemos evidenciar que es necesario realizar el análisis de este parámetro para realizar el recuento de bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa, para tener un mayor espectro de contaminación bacteriana en los alimentos.

Los resultados de la evaluación de la frutilla nos muestran la necesidad para que IBNORCA adopte Normativas Internacionales para recuento microbiológico de enterobacterias por placas Petrifilm, en frutas frescas listas para consumo, considerando la elevada demanda y distribución de estos alimentos en nuestro País.

Finalmente es importante resaltar el beneficio en el tiempo de emisión de resultados de las placas Petrifilm versus el método de referencia para el recuento de enterobacterias 24:48 hrs y para *Escherichia coli* 50:98 hrs respectivamente, esto acorde a datos de la revista “Environmental Leader Product & Project Awards” – 2016 estableciendo mayor eficiencia en el tiempo de emisión de resultados por las placas Petrifilm™, porque no requiere realizar pasos adicionales para la confirmación de los microorganismos en experimento.

## 12. CONCLUSIONES

- 1) La obtención e interpretación de resultados se realizó satisfactoriamente de acuerdo con la Norma ISO 16140-2:2016, en complementariedad con procedimientos Normativos Nacionales e Internacionales referenciales de Laboratorio.
- 2) El desempeño de las placas Petrifilm™, para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli* en queso y frutilla fresca, es un método selectivo y específico para el fin previsto; evidenciando inclusividad del 100% y 95,5% respectivamente; ambos con el 100% de exclusividad.  
Las placas Petrifilm™, para el recuento de enterobacterias tienen la capacidad de recuperar 20 UFC/g en queso fresco y no así en la frutilla.  
Las placas Petrifilm™, para el recuento de *Escherichia coli* no recupera 20 UFC/g en queso fresco ni frutilla.  
La Veracidad Relativa muestra alto grado de relación entre la respuesta obtenida por las placas Petrifilm™ y el método de referencia en ambas categorías alimentarias.  
El desempeño entre las placas “Petrifilm™” y el cultivo de referencia, para recuento de enterobacterias y *Escherichia coli*, en queso fresco, es estadísticamente igual  
El desempeño entre las placas “Petrifilm™” y cultivo de referencia, para recuento de enterobacterias y *Escherichia coli*, en frutilla fresca, es estadísticamente diferente,  
El 100% de los perfiles de precisión de los métodos evaluados están dentro del Límite de Aceptabilidad establecido en los criterios de rendimiento normativos
- 3) Los resultados del análisis de 15 muestras de mercados populares tuvieron relación con los resultados de la verificación del desempeño de los métodos evaluados.

### 13. RECOMENDACIONES

Las Instituciones normativas locales como el IBNORCA, deberían actualizar sus requisitos y parámetros normativos para el análisis microbiológico de alimentos frescos listos para consumo, en función a las recomendaciones de las Normas Internacionales como ser la ISO 16140-2:2016.

Se recomienda a las Instituciones de control microbiológico en alimentos realizar el análisis conjunto de enterobacterias y *Escherichia coli*, en los alimentos listos para consumo, para obtener un rango más amplio de datos que pudieran marcar la diferencia entre un alimento inocuo y contaminado.

Para el recuento de enterobacterias y *Escherichia coli* en queso fresco, se recomienda usar las placas Petrifilm™, porque el tiempo en la obtención de resultados es menor al método alternativo y los resultados no difieren estadísticamente entre ellos.

Para el recuento de *Escherichia coli* en la frutilla, se recomienda usar el método de referencia, ya que en concentraciones bacterianas bajas existe mayor sesgo que podría ser un factor limitante en la confiabilidad de resultados en alimentos de pH ácido.

Al aplicar las placas Petrifilm™ en las muestras cuyas concentraciones bacterianas sean presuntivamente elevadas, se recomienda hacer diluciones de las muestras para obtener resultados confiables.

#### **14. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Se busca hacer conocer los resultados de este trabajo de investigación a las Instituciones Nacionales como: IBNORCA, RELOAA, SENASAG, etc., para que las mismas puedan realizar el control y vigilancia de la inocuidad alimentaria en función a las recomendaciones realizadas.

## **15. GLOSARIO**

### **Alimento**

Cualquier material o producto destinado a ser, o esperado que sea utilizado para el consumo humano o animal

### **Analito**

Componente representado en nombre de una cantidad medible. Unidad o un grupo de microorganismos (o sus productos), cuantificadas o detectadas por el método de análisis.

### **Aplicabilidad**

Los analitos, matrices y concentraciones para los cuales puede utilizarse satisfactoriamente un método de análisis con el fin de determinar su conformidad con una norma de referencia

### **B-ETI**

Rango de valores dentro del cual se espera que se encuentre una proporción determinada de la población. La proporción indicada representa la probabilidad de que un valor se encuentre entre un valor superior e inferior.

### **Blanco matriz**

Matriz que no contiene el analito de interés u objetivo para el método seleccionado.

### **Criterios de aceptabilidad y rechazo**

Exigencias de una característica de funcionamiento o comportamiento en función de las cuales se puede determinar que un método analítico es adecuado, para la finalidad perseguida y ofrecer resultados confiables.

### **Categoría**

Grupo de tipos de muestra del mismo origen

### **Ensayo:**

Operación realizada de acuerdo a un procedimiento específico, que consiste en la determinación cualitativa y/o cuantificación de una o más características en un determinado producto

### **Error aleatorio**

Es aquel error inevitable que se produce por eventos únicos imposibles de controlar durante el proceso de medición. Este error ocurre por el azar.

### **Error Sistemático**

Es aquel que se produce de igual modo en todas las mediciones, se realizan de una magnitud de medición que al reiterar las mediciones se mantiene constante o bien varía de manera predecible. El error sistemático está condicionado por algún factor distinto al azar.

### **Exactitud**

Es complementario al término de eficacia o veracidad. Dado que en microbiología no es posible en la práctica, obtener un valor de referencia, debemos emplear en su caso el término relativo, puesto que el valor de referencia se obtiene mediante el propio análisis de la muestra, con un método de referencia aceptado.

### **Estudio de exclusividad**

Estudio con cepas puras no objetivo que muestran la falta de interferencia, en un método alternativo, a partir de un rango amplio de cepas no-diana sin estimar el efecto matriz

### **Estudio de inclusividad**

Estudio con cepas diana puras que deben detectarse o enumerarse por el método alternativo a partir de un amplio rango de cepas, sin estimar el efecto matriz

### **Intervalo de confianza**

Valor  $(1 - \alpha)$  de la probabilidad asociada a un intervalo de confianza o a un intervalo de cobertura estadística.

### **Ítem**

Artículo de alimento único especificado, pienso, medio ambiente o matriz de producción primaria

### **Incertidumbre**

Parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando.

### **Linealidad**

Aptitud del método para dar resultados que están en proporción con la cantidad de microorganismos presentes en la muestra

### **Límite de cuantificación LOQ - para métodos cuantitativos**

Concentración más baja de analito que se puede cuantificar un método de ensayo aceptable.

**Método alternativo**

Método enviado para validación, método de análisis que detecta o cuantifica, para una categoría determinada de productos, el mismo analito que se detecta o cuantifica utilizando el método de referencia correspondiente,

**Método de referencia**

Método internacionalmente reconocido y ampliamente aceptado.

**Mensurando:**

Cantidad destinada a la medida.

**Método cualitativo**

Método que permite determinar la presencia o ausencia de un analito en una muestra o matriz.

**Método cuantitativo**

Método que permite determinar la concentración de un analito presente en una muestra o matriz.

**Metrología**

Ciencia de las mediciones o campo de los conocimientos relativos a las mediciones del campo científico o tecnológico.

**Nivel**

Es la concentración de una sustancia de interés en una solución estándar o matriz generalmente, se habla en términos de nivel de concentración.

**Nivel de confianza**

Probabilidad específica de obtener algún resultado de una muestra si no existía en la población en su conjunto. Los niveles habituales de probabilidad están entre el 95 % al 99 %.

**Parcialidad - sesgo de medición**

Estimación de un error de medición sistemático, o la diferencia sistemática entre el valor cuantitativo, valor asignado y el promedio de la medición de dos resultados.

**Precisión de la medición**

Proximidad de concordancia entre un valor de cantidad medido y un valor de cantidad asignado de un mensurando.

**Perfil de precisión**

Representación gráfica de la capacidad de medida del método cuantitativo, obtenida por combinando de intervalos de aceptabilidad e intervalos de tolerancia de expectativa  $\beta$ , ambos informados a diferentes niveles del valor de referencia.

**Planta rastrera**

Es aquella que no superan los 30 o 50 centímetros de altura.

**Sistema Internacional de Unidades (SI)**

Sistema de unidades, basado en el Internacional Sistema de cantidades, sus nombres y símbolos, incluyendo una serie de prefijos y sus nombres y símbolos, así como las normas para su uso, aprobada por la Conferencia General de Pesas y Medidas (CGPM).

**Validación**

Cuando los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto

**Verificación**

Aportación de evidencia objetiva de que un ítem dado satisface los requisitos especificados

**Veracidad**

El grado de concordancia entre la expectativa relativa al resultado de un ensayo o de una medición y el valor verdadero.

## 16. BIBLIOGRAFÍA

- © THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. (2020 ). Agar de glucosa de bilis rojo violeta. Madrid: Thermo Scientific Oxoid CM1082B.
- 3MPetrifilm™. (2023). 3MPlacas Petrifilm™. (3M, Productor) Recuperado el 15 de junio de 2023, de [https://www.3m.com.bo/3M/es\\_BO/food-safety-la/petrifilm/](https://www.3m.com.bo/3M/es_BO/food-safety-la/petrifilm/)
- ALEXANDRA, A. N. (Diciembre de 2008). Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm™3M para el análisis de alimentos. Bogota.
- BORIS DUFFAU, F. R. (Ed.). (diciembre de 2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de medicion . Aspectos generales de la validacion. Santiago, Chile.
- BRAMBILA, D. E. (2012). Validación y verificación de sistemas de medición en el laboratorio clínico. 3. Puebla, México. Obtenido de <https://www.ifcc.org/media/216093/Validacion.pdf>
- BRITANIA. (diciembre de 2021). Violeta Rojo y Bilis Agar. 2, 1. Argentina : Laboratorios Britania SA. Obtenido de [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_60709eae6caa7.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60709eae6caa7.pdf)
- CANET, J. J. (2020). *Escherichia Coli*: características, patogenicidad y prevención. Recuperado el 10 de abril de 2023, de BETELGEUX-CHRISTEYNS: <https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>
- CARAVACA, G. M. (2018). Control de Inocuidad en la Industria Alimentaria. Microorganismos indicadores, 1-5. Instituto Nacional de Aprendizaje. Recuperado el 2021, de [https://www.inapidte.ac.cr/pluginfile.php/14407/mod\\_resource/content/11/assets/microorganismos-indicadores.pdf](https://www.inapidte.ac.cr/pluginfile.php/14407/mod_resource/content/11/assets/microorganismos-indicadores.pdf)
- CLARÍN. (28 de agosto de 2016). Beneficios de la frutilla. 1. Obtenido de [https://www.clarin.com/nutricion/beneficios-frutilla\\_0\\_rkLkhAOw7x.html](https://www.clarin.com/nutricion/beneficios-frutilla_0_rkLkhAOw7x.html)
- CODEX ALIMENTARIUS. (2015). Contaminante alimentario. Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos, 1-4. España.

- CORTES, G. (2004). Supervivencia y cambio en las sociedades campesinas andinas de Bolivia. Migración y seguridad alimentaria, 317-376. La Paz, Bolivia : Institut français d'études andines. doi:10.4000/books.ifea.4389
- DARIEL INTRIAGO BERMÚDEZ<sup>1;2</sup>, MARCO ANTONIO ZAMBRANO ALCIVAR<sup>1;3</sup>, MARÍA ISABEL BOLAÑOS LUCAS<sup>2</sup>, ELY FERNANDO SACÓN VERA. (diciembre de 2018). Comparación de métodos 3MPetrifilm™ y convencional para conteo rápido de aerobios en productos de cacao. Ecuador.
- DARIEL, B. I., ALCIVAR, M. A., LUCAS, M. I., & VERA, E. F. (11 de Diciembre de 2018). Comparación de métodos 3MPetrifilm™ y convencional para conteo rápido de aerobios en productos de cacao. *espanciencia*, 9(2).
- DIRECCION GENERAL DE SERVICIOS DE SALUD - Unidad de Epidemiologia. (1 de julio de 2019). Parte epidemiologico. Bolivia: Ministerio de Salud.
- Directrices sobre sistemas de control de las importaciones de alimentos (CAC/GL, 47-2003). (2003).
- ELMER KONEMAN. (2006). Diagnóstico Microbiológico (6 ed.). (W. y. Wilkins, Ed.) Washinton, USA: Medica Panamericana S.A. Obtenido de [www.medicapanamericana.com](http://www.medicapanamericana.com)
- ENCICLOPEDIA WIKIPEDIA. (julio del 2019). Obtenido de [https://es.wikipedia.org/wiki/Conteo\\_bacteriano#Conteo\\_en\\_caja\\_de\\_petri](https://es.wikipedia.org/wiki/Conteo_bacteriano#Conteo_en_caja_de_petri)
- FAO. (1996). Manuales para el Control de Calidad de los Alimentos. 82, 102. Roma, Italia
- FIGUEROA , A., LEON , W., FERNANDEZ , N., & GOTTRET, J. (2014). I Implementación del método alternativo 3MPetrifilm™ para determinar coliformes y bacterias aerobias mesófilas en la industria. *11(35)*, 58-64. Cochabamba, Bolivia. DOI:ISSN 2075-8936
- FORNÉS, D. T. (marzo de 2014). Metodología para validación interna de métodos de ensayo microbiológicos alternativos en alimentos. Santiago, Chile.
- FUENTES, A. F. (2021). Verificación de placas Petrifilm™ RYM (Rapid Yest and Mold) 3M para estudio de las matrices de crema de leche y Tampico en la planta Jenaro Pérez de la Cooperativa Colanta. 2-25. Córdoba, Argentina.

- GONZALES, P. J. (2007). Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en muestras 8-11. Bogota, Colombia.
- GONZÁLEZ, M. D. (Agosto de 2016). Verificación del método Simplate® Total Plate Count Color Indicator (TPC CI), comparado con el método estándar de recuento en placa por vertido, para el recuento total de microorganismos aeróbicos mesófilos en productos terminados y materias primas. Guatemala.
- GUZMÁN, E. G. (Octubre de 2016). Inclusión de frutilla orgánica en las compras para desayuno escolar. 1-2. Bolivia: Inter Aprendizaje.
- HORACIO A. LOPARDO, S. C. (Ed.). (2016). Manual de microbiología clínica de microbiología - (Vol. I). Buenos Aires, Argentina. Recuperado el julio de 2019
- IBNORCA. (Diciembre de 2002). Norma Boliviana 32005. Recuento de bacterias coliformes, primera , 1-2. Bolivia.
- INLASA. (20 de septiembre de 2021). La Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (RELOAA). 1-5. La Paz, Bolivia.
- INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA. (diciembre de 2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Aspectos generales sobre la validación de metodos, 20-25. Santiago de Chile, Chile.
- JAWETZ, M. &. (2017). Microbiología médica. (27 ed.). En J. A. Karen C. Carroll, CAPÍTULO 15: Bacilos gramnegativos entéricos (*Enterobacteriaceae*) Mexico, D.F.: Mc Graw Hill Interamericana editores ,S.A.
- LAGOMARSINO, M. (2019). Manual de microbiología aplicada a las industrias Farmacéutica, Cosmética y de productos Médicos. crecimiento microbiano, segunda , 3.4. Argentina . DOI:ISBN 978 987 4670 44
- LÓPEZ, A. M. (Junio de 2013). Validación y cálculo de incertidumbre para la determinación de microorganismos indicadores, mediante microbiología clásica y NMP automatizado, en matrices cárnicas". 34. Asturias, España.
- MARÍA RENÉ CALVO FLORES, D. C. (2006). Enterobacterias en lechugas expandidas en Hipermaxi, Ketal y mercado popular Rodríguez de la ciudad de La Paz, agosto-septiembre 2006. revista científica - sociedad científica de estudiantes de medicina.

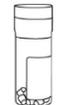
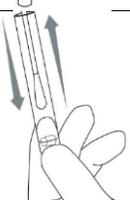
- MARTÍNEZ, C. G. (noviembre de 2017). Análisis gráfico de Bland-Altman. 1. California, Estados Unidos . Obtenido de [https://github.com/CristinaGil/Analisis\\_estadisticos\\_R](https://github.com/CristinaGil/Analisis_estadisticos_R)
- MEJÍA, N. E. (septiembre de 2017). Comparación de métodos Compact Dry y 3M™ Petrifilm™ con el método estándar INEN ISO 21149:2006 para el recuento de bacterias aerobias mesófilas en una crema cosmética. Quito, Ecuador.
- MERCOOP. (2022). Mercado de Abasto Córdoba. Recuperado el 12 de enero de 2023, de <http://mercadoabastocordoba.com/propiedades-nutritivas-y-para-la-salud-de-las-frutillas/>
- MICROBIOLOGICS . (2018). Rehidratacion de cepas: Lyfo Disk™, kwik stiktm plus. Instrucciones de uso. España.
- MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y BIENESTAR SOCIAL. (2023). Frutilla, alimento y medicina. conoce las bondades de esta frutilla, 1. Paraguay. Recuperado el 16 de enero de 2023, de <https://www.mspbs.gov.py/portal/13039/frutilla-alimento-y-medicina-conoce-las-bondades-de-esta>
- NB/ISO/IEC 17025. (2017). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibracion. Tercera edición.
- NORMA BOLIVIANA 32014. (Octubre de 2014). Ensayos microbiologicos . Recuento de Enterobacterias . Instituto Boliviano de Normalización y Calidad.
- NORMA CHILENA. (mayo de 1997). Reglamento sanitario de los alimentos. 21. doi:DTO. N° 977/96
- NORMA INTERNACIONAL NB/ISO/IEC 17025. (febrero de 2018). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Ginebra, Suiza: IBNORCA.
- OMS. (4 de junio de 2019). Inocuidad de los alimentos. <https://www.who.int/es/health-topics/food-safety>
- OMS, OPS. (marzo de 2017). El consentimiento informado en el CCyCN y en la ley 26529 de derechos del paciente. Consentimiento Informado, 1. Recuperado el junio de 2022, de [https://salud.gob.ar/dels/entradas/el-consentimiento-informado-en-el-ccycn-y-en-la-ley-26529-de-derechos-del-paciente#:~:text=El%20consentimiento%20informado%20\(CI\)%20es,disponible%2C%20las%20alternativas%20terap%C3%A9uticas%2C%20los](https://salud.gob.ar/dels/entradas/el-consentimiento-informado-en-el-ccycn-y-en-la-ley-26529-de-derechos-del-paciente#:~:text=El%20consentimiento%20informado%20(CI)%20es,disponible%2C%20las%20alternativas%20terap%C3%A9uticas%2C%20los)

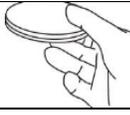
- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). (febrero de 2018). *E. coli*.  
Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/E-coli>
- PACO, J. P. (2016). Estudio comparativo entre el método de cultivo convencional y de placa seca rehidratable, para el recuento de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos de elaboración artesanal de expendio en mercados populares de la ciudad de la Paz- Bolivia.
- PALANCARES. (enero de 2021). Proteínas y otros beneficios del queso fresco. 1. España.  
Obtenido de <https://www.palancares.com/proteinas-beneficios-del-queso-fresco>
- PÉREZ GUERRERO, F. SÁNCHEZ, D. GUTIÉRREZ, SABORIDO, GUERRERO LOZANO. (mayo de 2014). Infecciones por enterobacterias. ELSEVIER, 11, 3276-3282.
- PETRIFILM 3M. (2009). Instrucciones de Uso y Guía de Interpretación para el recuento de *Enterobacteriaceae*. 1-66. México.
- QUIRÓS, C. (diciembre de 2016). Expandiendo su programa de monitoreo ambiental. Indicadores Sanitarios(5), 5. Providencia, Chile: Food Safety.
- RAMOS ENDARA, J. A. (2011). Comparación de los recuentos de las Placas Petrifilm™ EC/coliformes para la determinación de coliformes totales y *E. coli* con el medio M-colibblue24 para análisis de agua potable, 2;60-70. Ecuador. obtenido de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/4056>
- RANNOU, M. (2021). Validación de métodos analíticos alternativos. Informe de Laboratorio , Laboratorios ADRIA , Francia. Recuperado el enero de 2021
- RAY, G., & KENNETH, R. (2017). Enterobacterias (6 ed.). (S. M. médica, Ed., & B. R. Muñoz, Trad.) Distrito Federal, Mexico: McGRAW-HILL MEDICAL. Obtenido de <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?>
- RED DE LABORATORIOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIOS (RELOA). (enero a junio de 2019). Situación epidemiológica de EDAs - Bolivia, enero a junio 2019. Parte Informativo, 3-4.
- Red de Laboratorios de Análisis de Laboratorios (RELOAA). (enero a junio de 2019). Situación epidemiológica de EDAs - Bolivia, enero a junio 2019. Parte Informativo, 3-4.
- Redes en Salud Pública . (20 de 11 de 2015). Manejo de cepas de referencia y colección.

- RETAMAL, V. H. (2015). Verificación de un método alternativo para la detección de *Salmonella spp.* en matrices de alimentos. Santiago de Chile.
- ROMAN MOLLEDA, M. (2016). Frecuencia de enterobacterias en queso fresco, carne molida y fresa en el mercado mayorista “La Parada”, 16-17. Lima, Perú.
- ROMÁN, M. M. (Enero de 2016). Frecuencia de enterobacterias en queso fresco, carne. Lima, Perú.
- SÁNCHEZ, M. G. (2018). Evaluación y comparación del método Petrifilm 3M lab en el recuento de bacterias acidolácticas homofermentativas frente a la técnica tradicional de siembra en agar APT para el análisis de productos cárnicos. 7-40. Colombia. Recuperado el diciembre de 2021.
- SANITARIA, R. L. (2017). Condición inmunológica. Bogotá, Colombia.
- SANTOS, R. M. (18 de mayo de 2004). Métodos rápidos y automatizados aplicados. 1-3. España, Madrid.
- SEGURO SOCIAL UNIVERSITARIO . (2020). Regimen de asignaciones familiares. obtenido de biblioteca SSU: <https://ssucbba.org/regimen-de-asignaciones-familiares/>
- SUAREZ, F. (diciembre de 2016). Plan 3MPetrifilm®, mejorando la productividad, reduciendo los costos. 5, 8. Chile : Unilever SCC Chile Ltda.
- TOLA, Y. J. (Agosto de 2019). Diseño y desarrollo del queso neufchâtel tipo “Philadelphia”, a partir de un fermento gelificado para la empresa LÁCTEOSBOL Achacachi. 16. La Paz, Bolivia.
- UNE-EN ISO 16140-2. (2016). Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia., 16. Madrid, España: AENOR.
- UNICOM-MDPyEP-PRO BOLIVIA. (31 de mayo de 2021). Consumo per cápita de leche en Bolivia sube a 64,5 litros. <https://produccion.gob.bo/?p=13269>. la paz, Bolivia.
- VARELA, Y., MILLÁN, B., & ARAQUE, M. (2017). Diversidad genética de cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. (I. N. Colombia, Ed.) Biomédica, 37, 209-210.

## 17. ANEXOS

### ANEXO 1 Protocolo de rehidratación de cepas ATCC DE REFERENCIA - LYFO DISK™

N° de paso	Actividad	Esquema
1	Retire el frasco del almacenamiento entre 2°C y 8°C y déjelo que se adapte a la temperatura ambiente.	
2	Quite de forma aséptica 1 gránulo del frasco con una pinza estéril. No retire el material desecante.	
3	Coloque el gránulo en 0,5 ml de líquido estéril (BHI). De inmediato, coloque el tapón y la tapa del frasco y vuelva a almacenarlo a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C. por 5 minutos	
4	Aplaste el gránulo con un hisopo estéril hasta lograr una suspensión homogénea. Adicione al tubo 20 ml de caldo BHI	
5	<b>De inmediato</b> , sature el hisopo abundantemente con el material hidratado e inocule a la(s) placa(s) de cultivo principal girando con suavidad el hisopo sobre un tercio de la placa.	
6	Por medio de un asa esterilizada, haga estrías para facilitar el aislamiento de la colonia.	
7	<b>De inmediato</b> , incube la(s) placa(s) invertida(s) y el tubo de cultivo principal, inoculada(s) a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo. 24 hrs a T° 35±2	
8	Pasada la incubación, a partir de la placa hacer tinción Gram y pruebas de identificación bioquímica de la cepa	
9	Del contenido del tubo de BHI alicuotar 0,5 ml a crio viales con 1 ml de Skin milk powder	

10	Almacenar los crio viales identificados a -70°C; estos contienen <b>CEPAS STOCK</b> identificar con la inicial R1(significa que es el primer repique)	
11	Inactive con hipoclorito 1% el resto del material hidratado de forma apropiada para desecharlos en contenedores de riesgo biológico.	
<b>N° de paso</b>	<b>CEPAS DE TRABAJO - actividades</b>	
1	Atemperar los crio viales R1 y sembrar por agotamiento, el número necesario de placa(s) que contengan agar nutritivo	
2	De inmediato, incube la(s) placa(s) invertida(s), a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo. 24 hrs a T° 35±2	
3	Pasada la incubación, a partir de la placa hacer tinción Gram y pruebas de identificación de la cepa	
4	Con un isopo estéril, recoger el crecimiento microbiano en la(s) placa(s) y disolver en el crio vial que contiene 1 ml de Skin milk powder	
5	Almacenar los viales identificados, de -20 o -70 C° dependiendo del uso. Identificar con la inicial R2 (significa que es el segundo repique)	
6	Inactive con hipoclorito 1%, el material usado de forma apropiada para desecharlos en contenedores de riesgo biológico.	

Fuente: MICROBIOLOGICS. (2018). rehidratación de cepas: LYFO DISK™, KWIK STIK™ PLUS. Instrucciones de uso. España, Redes en Salud Pública. (20 de 11 de 2015). Manejo de cepas de referencia y colección.

## ANEXO 2 Manejo de almacenamiento de cepas de referencia y colección

Microorganismo	Agar recomendado	Caldo recomendado	Tiempo de incubación (horas)	Temperatura de incubación / atmósfera	Criopreservante	Observaciones
Enterobacterias	BHI Trypticase soya	BHI Trypticase soya	18 - 24	35 ± 2 °C aerobiosis	Skim milk powder 20%	Recoger con escobillón o asa desechable. Almacenar a -70 ± 10 °C
Bacilos Gram negativos no fermentadores	BHI Trypticase soya	BHI Trypticase soya	18 - 24	35 ± 2 °C aerobiosis	Skim milk powder 20%	Recoger con escobillón o asa desechable Almacenar a -70 ± 10 °C
Cocos Gram positivos	Sangre de cordero 5%	BHI Trypticase soya	18 - 24	35 ± 2 °C aerobiosis	Skim milk powder 20%	Recoger con escobillón o asa desechable Almacenar a -70 ± 10 °C
<i>Campylobacter spp</i>	Campy	Caldo Bolton No sobrevive en caldo. Siempre sembrar en agar sólido	24 -48	40 ± 2 °C microaerofilia	Skim milk powder 10%	Recoger con asa desechable Almacenar a -70 ± 10 °C
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sangre de cordero 5%	No sobrevive en caldo. Siempre sembrar en agar sólido	18 - 24	35 ± 2 °C CO <sub>2</sub> de 4 - 5%	Skim milk powder 20%	Recoger con escobillón o asa desechable Almacenar a -70 ± 10 °C
<i>Haemophilus influenzae</i>	Agar chocolate	No sobrevive en caldo. Siempre sembrar en agar sólido	18 - 24	35 ± 2 °C CO <sub>2</sub> de 4 - 5%	Skim milk powder 20%	Recoger con escobillón o asa desechable Almacenar a -70 ± 10 °C
<i>Neisseria meningitidis</i>	Sangre de cordero 5%	BHI Trypticase soya No sobrevive en caldo. Siempre sembrar en agar sólido	18 - 24	35 ± 2 °C aerobiosis	GC con glicerol al 30 %	Recoger con escobillón o asa desechable Almacenar a -70 ± 10 °C

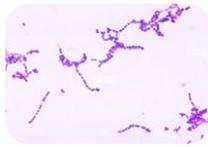
Fuente: “Instituto Nacional de Salud” (INT-R01.5330-041:2015)

### ANEXO 3 Pruebas bioquímicas de identificación bacteriana

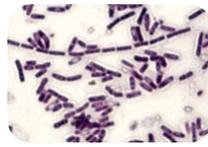
#### Tinción Gram de los cultivos experimentados



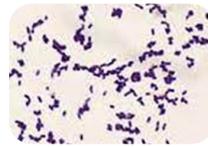
enterobacterias



*Staphylococcus spp.*



*Bacillus cereus*



*Listeria spp.*



*Pseudomonas aeruginosa*

Fuente: Elaboración propia de cultivos de Laboratorio

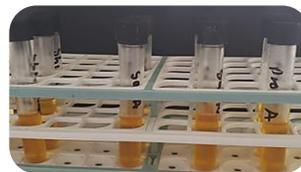
#### Pruebas selectivas y diferenciales para la confirmación de enterobacterias y *Escherichia coli*



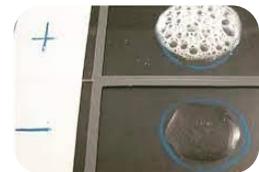
Caldo verde brillante



Caldo *Escherichia coli*



Prueba de oxidación/fermentación



Prueba de la catalasa

#### Batería bioquímica



no fermentadora de lactosa



fermentadora de lactosa productora de  $\text{SH}_2$



fermentadora de lactosa no productora de  $\text{SH}_2$

Fuente: Elaboración propia de cultivos de Laboratorio

### **Pruebas confirmatorias para *Escherichia coli***

- En función al recuento bacteriano, confirmar 3, 5 o 7 colonias sospechosas
- Inocular cada colonia en un tubo de fermentación que contenga caldo EC y un tubo con caldo verde brillante
- Incubar el caldo EC a 44,5°C por 24-48 horas en baño maría (positivo para *E. coli*)
- Verde brillante 24-48 hrs a 35±2 °C (positivo para coliformes totales)

### **Expresión de resultados**

- Los resultados se expresan cualitativamente
- Positivo: Cuando al menos 1 tubo da positivo con formación de gas
- Negativo: cuando ninguno da formación de gas

### **Cálculo de los resultados**

- De las colonias sometidas a confirmación se emplea la siguiente formula:

$$\text{Rec. Confirmado} = \text{Rec. Presuntivo} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias conf.} * \text{la dilución empleada}}{\text{N}^\circ \text{ de colonias sometidas a confirmación}}$$

### **Pruebas confirmatorias para enterobacterias**

- Sembrar por estría al menos 2 – 5 colonias típicas en
- Placas de agar bilis glucosa rojo neutro cristal violeta e incubar a 35±2°C durante 20 a 24 hrs.
- Sembrar por estría en agar nutritivo inclinado, al menos 2 colonias rodeadas de una zona de precipitado purpura, sembrar también dichas colonias por picadura en tubos de medio OF, cubriéndolos posteriormente con aceite mineral estéril e incubar a 35±2°C durante 20 a 24 hrs.
- Llevar a cabo la prueba de la oxidasa con el crecimiento procedente del agar inclinado

### **Para la prueba de la oxidasa:**

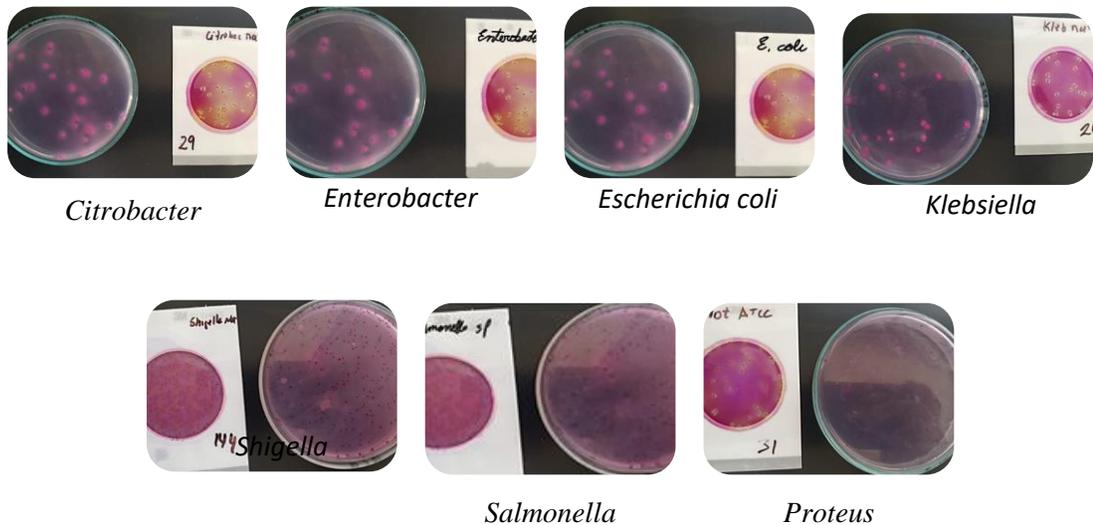
- Colocar un trozo cuadrado de papel filtro, dentro de una caja Petri vacía y añadir en el centro 3 gotas de la solución de dihidrocloruro de tetrametilparafenilendiamina. Extender cuidadosamente un asa de cultivo sobre el papel impregnado de reactivo, formando una línea de 3 a 6 mm
- La prueba de la oxidasa es positiva si el cultivo que se ha extendido toma un color púrpura oscuro en 5 a 10 s
- Si la prueba de la oxidasa es negativa y el cultivo en agar OF toma un color amarillo, se ha probado la presencia de Enterobacteriaceae.

**ANEXO 4. Recuento de la población bacteriológica de las cepas ATCC y nativas resuspendidas en el laboratorio**

<b>Nro.</b>	<b>Cepas ATCC</b>	<b>ATCC</b>	<b>Promedio de células viables en 1 UFC aislada</b>
1	<i>Bacillus cereus</i>	10876	1,6 x10 <sup>7</sup>
2	<i>Citrobacter freundii</i>	8090	1,0 x10 <sup>9</sup>
3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	1,9 x10 <sup>9</sup>
4	<i>Escherichia coli</i>	10536	1,6 x10 <sup>9</sup>
5	<i>Listeria monocytogenes</i>	19111	1,0 x10 <sup>6</sup>
6	<i>Listeria innocua</i>	33090	1,0 x10 <sup>6</sup>
7	<i>Proteus mirabilis</i>	12453	1,3 x10 <sup>9</sup>
8	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	10145	1,0 x10 <sup>9</sup>
9	<i>Salmonella typhimurium</i>	13311	1,1 x10 <sup>9</sup>
10	<i>Shigella sonnei</i>	25931	1,7 x10 <sup>8</sup>
11	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	1,6 x10 <sup>8</sup>
11	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	1,2 x10 <sup>8</sup>
<b>Nro.</b>	<b>Cepas Nativas</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Promedio de células viables en 1 UFC aislada</b>
1	<i>Bacillus cereus spp.</i>	Cereales	1,0 x10 <sup>7</sup>
2	<i>Citrobacter spp.</i>	Frutilla	1,0 x10 <sup>9</sup>
3	<i>Citrobacter spp.</i>	Queso	1,1 x10 <sup>9</sup>
4	<i>Citrobacter spp.</i>	Lechuga	1,2 x10 <sup>9</sup>
5	<i>Citrobacter spp.</i>	Carne de pollo	1,1 x10 <sup>9</sup>
6	<i>Enterobacter spp.</i>	Queso	9,2 x10 <sup>8</sup>
7	<i>Enterobacter spp.</i>	Lechuga	9,8 x10 <sup>8</sup>
8	<i>Escherichia coli</i>	Lechuga	1,3 x10 <sup>9</sup>
9	<i>Escherichia coli</i>	Frutilla	9,2 x10 <sup>8</sup>
10	<i>Escherichia coli</i>	Queso	1,5 x10 <sup>9</sup>
11	<i>Escherichia coli</i>	Carne de polo	1,7 x10 <sup>9</sup>
12	<i>Escherichia coli</i>	<i>O:111</i>	8,5 x10 <sup>8</sup>
13	<i>Escherichia coli</i>	<i>O:91</i>	8,7 x10 <sup>8</sup>

14	<i>Escherichia coli</i>	O:145	1,3 x10 <sup>9</sup>
15	<i>Klebsiella spp.</i>	Queso	1,0 x10 <sup>9</sup>
16	<i>Klebsiella spp.</i>	Lechuga	1,3 x10 <sup>9</sup>
17	<i>Klebsiella spp.</i>	Carne de pollo	1,4 x10 <sup>9</sup>
18	<i>Proteus spp.</i>	Lechuga	1,2 x10 <sup>9</sup>
19	<i>Proteus spp.</i>	Carne de pollo	1,4 x10 <sup>9</sup>
20	<i>Pseudomona spp.</i>	Lechuga	9,9 x10 <sup>8</sup>
21	<i>Pseudomona spp.</i>	Carne de pollo	1,0 x10 <sup>9</sup>
22	<i>Salmonella spp.</i>	Carne de pollo	7,7 x10 <sup>8</sup>
23	<i>Staphylococcus aureus</i>	Queso	1,0 x10 <sup>8</sup>
24	<i>Staphylococcus aureus</i>	Carne de pollo	1,1 x10 <sup>8</sup>
25	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Queso	1,5 x10 <sup>8</sup>
26	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Carne de pollo	1,8 x10 <sup>8</sup>

**ANEXO 5 Fotos de las placas Petrifilm™ y las placas de agar, en el estudio de la inclusividad para el recuento de enterobacterias**

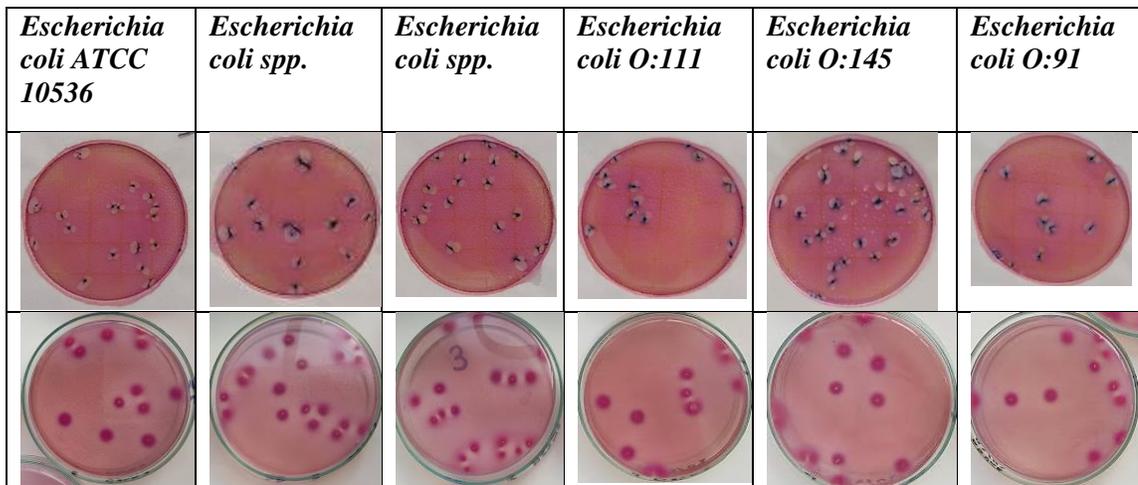


Fuente: Elaboración propia de cultivos de Laboratorio, en las gráficas se puede apreciar las placas Petrifilm™ del lado izquierdo y las placas de agar del lado derecho.

**ANEXO 5 Recuento de 100 UFC/g de enterobacterias, aplicando el método de referencia y las placas Petrifilm™ para la determinación de la inclusividad**

Nro.	Microorganismos	Metodo de referencia	Metodo alternativo	Recuento en PCA
1	<i>Citrobacter freundii</i> (vegetales)	97	98	98
2	<i>Citrobacter freundii</i> (vegetales)	99	99	99
3	<i>Citrobacter freundii</i> (vegetales)	98	97	98
4	<i>Citrobacter freundii</i> (vegetales)	97	97	97
5	<i>Citrobacter freundii</i> (vegetales)	98	100	101
6	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	100	101	101
7	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	99	99	100
8	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	99	100	100
9	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	98	99	99
10	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	96	97	97
11	<i>Enterobacter aerogenes</i> (queso)	97	98	98
12	<i>Enterobacter aerogenes</i> (queso)	99	100	100
13	<i>Enterobacter aerogenes</i> (queso)	97	98	98
14	<i>Enterobacter aerogenes</i> (queso)	98	98	99
15	<i>Enterobacter aerogenes</i> (queso)	96	97	97
16	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	102	101	102
17	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	100	99	101
18	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	100	101	100
19	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	102	102	102
20	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	103	104	104
21	<i>Escherichia coli</i> (pollo)	99	100	101
22	<i>Escherichia coli</i> (pollo)	98	99	99
23	<i>Escherichia coli</i> (pollo)	96	96	97
24	<i>Escherichia coli</i> (pollo)	99	98	99
25	<i>Escherichia coli</i> (pollo)	99	98	99
26	<i>Klebsiella oxytoca</i> (vegetales)	94	95	96
27	<i>Klebsiella oxytoca</i> (vegetales)	97	97	98
28	<i>Klebsiella oxytoca</i> (vegetales)	97	98	99
29	<i>Klebsiella oxytoca</i> (vegetales)	97	99	99
30	<i>Klebsiella oxytoca</i> (vegetales)	99	98	98
31	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	98	99	100
32	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	96	98	98
33	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	95	98	98
34	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	94	97	98
35	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	96	96	99
36	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	96	97	97
37	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	95	97	99
38	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	96	97	98
39	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	98	98	98
40	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	98	100	100
41	<i>Salmonella spp.</i> (pollo)	95	96	96
42	<i>Salmonella spp.</i> (pollo)	94	95	94
43	<i>Salmonella spp.</i> (pollo)	96	98	98
44	<i>Salmonella spp.</i> (pollo)	96	97	97
45	<i>Salmonella spp.</i> (pollo)	96	97	98
46	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	95	97	97
47	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	93	96	96
48	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	94	97	98
49	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	93	95	98
50	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	94	96	97
<b>PROMEDIO DE RECuento</b>		97	98	99

**ANEXO 6 Fotos de las placas Petrifilm™ y las placas de agar, en el estudio de la inclusividad para el recuento de recuento de *Escherichia coli***



Fuente: Elaboración propia de cultivos de Laboratorio, en las gráficas se puede apreciar las placas Petrifilm™ en la parte superior y las placas de agar en la parte inferior

**ANEXO 6 Recuento de 100 UFC/g de *Escherichia coli*, aplicando el método de referencia y las placas Petrifilm™ para la determinación de la inclusividad**

Nro.	Microorganismos	Metodo de referencia	Metodo alternativo	Recuento en PCA
1	<i>Escherichia</i> ATCC 10536	98	99	100
2	<i>Escherichia</i> ATCC 10536	96	95	96
3	<i>Escherichia</i> ATCC 10536	96	97	97
4	<i>Escherichia</i> ATCC 10536	97	97	97
5	<i>Escherichia</i> ATCC 10536	96	97	97
6	<i>Escherichia</i> ATCC 10536	95	97	97
7	<i>Escherichia coli</i> O:111	95	94	95
8	<i>Escherichia coli</i> O:111	96	96	97
9	<i>Escherichia coli</i> O:111	97	96	97
10	<i>Escherichia coli</i> O:111	94	94	94
11	<i>Escherichia coli</i> O:111	94	94	95
12	<i>Escherichia coli</i> O:111	95	95	96
13	<i>Escherichia coli</i> O:145	99	98	99
14	<i>Escherichia coli</i> O:145	98	98	98
15	<i>Escherichia coli</i> O:145	100	99	100
16	<i>Escherichia coli</i> O:145	100	98	100
17	<i>Escherichia coli</i> O:145	98	98	98
18	<i>Escherichia coli</i> O:145	100	99	101
19	<i>Escherichia coli</i> O:91	96	95	96
20	<i>Escherichia coli</i> O:91	96	94	96
21	<i>Escherichia coli</i> O:91	96	96	97
22	<i>Escherichia coli</i> O:91	95	95	95
23	<i>Escherichia coli</i> O:91	95	95	96
24	<i>Escherichia coli</i> O:91	96	96	97
25	<i>Escherichia</i> spp. (frutilla)	92	91	93
26	<i>Escherichia</i> spp. (frutilla)	93	92	93

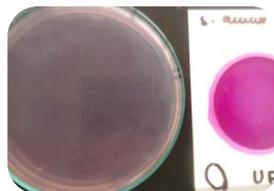
27	Escherichia spp. (frutilla)	94	94	95
28	Escherichia spp. (frutilla)	92	94	93
29	Escherichia spp. (frutilla)	95	93	97
30	Escherichia spp. (frutilla)	95	93	97
31	Escherichia spp. (queso)	97	96	97
32	Escherichia spp. (queso)	98	96	98
33	Escherichia spp. (queso)	97	97	97
34	Escherichia spp. (queso)	98	97	98
35	Escherichia spp. (queso)	97	96	97
36	Escherichia spp. (queso)	98	96	98
37	Escherichia spp. (vegetales)	98	96	98
38	Escherichia spp. (vegetales)	98	97	98
39	Escherichia spp. (vegetales)	99	99	99
40	Escherichia spp. (vegetales)	98	97	98
41	Escherichia spp. (vegetales)	98	97	99
42	Escherichia spp. (vegetales)	98	97	99
43	Escherichia spp. (pollo)	94	93	94
44	Escherichia spp. (pollo)	95	96	95
45	Escherichia spp. (pollo)	97	96	98
46	Escherichia spp. (pollo)	94	93	93
47	Escherichia spp. (pollo)	95	94	95
48	Escherichia spp. (pollo)	96	95	97
49	Escherichia spp. (pollo)	97	98	94
50	Escherichia spp. (pollo)	96	98	95
<b>PROMEDIO DE RECUENTO</b>		96,3	95,9	96,7

Fuente: Elaboración propia de cultivos de Laboratorio.

### ANEXO 7 Fotos de las placas Petrifilm™ y las placas de agar, en el estudio de la exclusividad para el recuento de enterobacterias



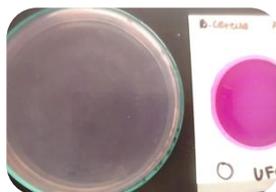
*Staphylococcus aureus*



*Staphylococcus epidermidis*



*Pseudomonas spp.*



*Bacillus spp.*



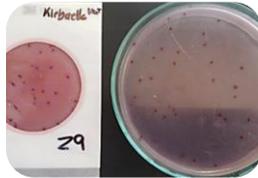
*Listeria monocytogenes*

Fuente: Elaboración propia de cultivos de Laboratorio, en las gráficas se puede apreciar las placas Petrifilm™ del lado izquierdo y las placas de agar del lado derecho.

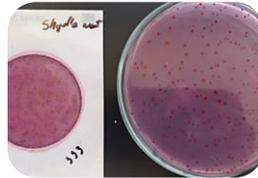
**ANEXO 8 Fotos de las placas Petrifilm™ y las placas de agar, en el estudio de la exclusividad para el recuento de *Escherichia coli***



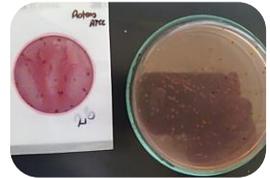
*Citrobacter*



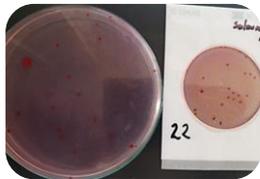
*Klebsiella*



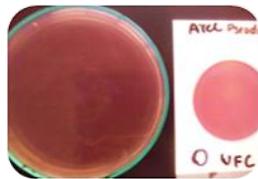
*Shigella*



*Proteus*



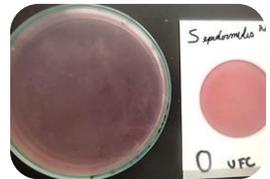
*Salmonella*



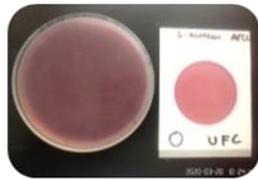
*Pseudomona*



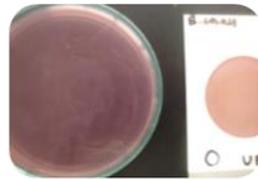
*Listeria  
monocytogenes*



*Staphylococcus  
epidermidis*



*Staphylococcus  
aureus*



*Bacillus*

Fuente: Elaboración propia de cultivos de Laboratorio.

**ANEXO 9 Fotos de las placas Petrifilm™ y las placas de agar en la evaluación del Límite de cuantificación**

Método de referencia	
Método alternativo	
<b>Límite de cuantificación de enterobacterias en queso fresco</b>	
Método de referencia	
Método alternativo	

**Límite de cuantificación de *Escherichia coli* en frutilla**

Método de referencia	
Método alternativo	

**Límite de cuantificación de *Escherichia coli* en queso fresco**

Método de referencia	
Método alternativo	

Fuente: Elaboración propia de resultados de cultivo en el Laboratorio SELADIS

**ANEXO 9 Recuento del límite de cuantificación del método de referencia frente a las placas Petrifilm™ para el recuento de enterobacterias y *E. coli* en queso y frutilla fresca.**

Recuento d enterobacterias					Recuento de <i>Escherichia coli</i>			
QUESO			FRUTILLA		QUESO		FRUTILLA	
Nro.	Método de referencia LogUFC/ml	Método alternativo LogUFC/ml	Método de referencia LogUFC/ml	Método alternativo LogUFC/ml	Método de referencia LogUFC/ml	Método alternativo LogUFC/ml	Método de referencia LogUFC/ml	Método alternativo LogUFC/ml
1	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00
2	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00
3	1,30	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
4	1,30	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
5	1,00	1,30	1,00	1,00	1,30	1,00	1,00	1,00
6	1,30	1,30	1,00	1,00	1,30	1,30	1,00	1,00
7	1,30	1,30	1,30	1,00	1,30	1,30	1,00	1,00
8	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,00
9	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,00
10	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,00
11	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,00
12	1,00	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
13	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
14	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
15	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
16	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
17	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,00	1,30	1,30
18	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
19	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
20	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
SUMA	24,82	24,82	23,21	21,91	24,82	24,21	22,91	20,71
X	1,24	1,24	1,16	1,10	1,24	1,21	1,15	1,04
DS	0,12	0,12	0,30	0,40	0,12	0,14	0,30	0,38
CV	10,0%	10,0%	26,2%	36,2%	10,0%	11,7%	26,5%	37,0%

Fuente: Elaboración propia de resultados de cultivo en el Laboratorio SELADIS