

**Verificación de los métodos para la
determinación de coliformes totales y
bacterias mesófilas aerobias en el Laboratorio
de Microbiología de Alimentos de Zamorano**

**Katheryn Jazmín Párraga Estrada
Paulina Magdalena Pilla Tituaña**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Verificación de los métodos para la determinación de coliformes totales y bacterias mesófilas aerobias en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieras en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Katheryn Jazmín Párraga Estrada
Paulina Magdalena Pilla Tituaña**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2013

Verificación de los métodos para la determinación de coliformes totales y bacterias mesófilas aerobias en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano

Presentado por:

Katheryn Jazmín Párraga Estrada
Paulina Magdalena Pilla Tituaña

Aprobado:

Mayra Márquez Gonzalez, Ph.D.
Asesora principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Verificación de los métodos para la determinación de coliformes totales y bacterias mesófilas aerobias en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano

**Katheryn Jazmín Párraga Estrada
Paulina Magdalena Pilla Tituaña**

Resumen. El proceso de acreditación del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ), bajo la Norma Internacional ISO/IEC 17025:2005, requiere de la verificación de los métodos de prueba. Los objetivos del estudio fueron verificar los parámetros de desempeño de los métodos de prueba por vertido de placas para la cuantificación de coliformes totales y bacterias mesófilas aerobias, en tres matrices alimenticias: carne molida de res, vegetales (maíz dulce enlatado) y leche; comprobar que factores externos como: ambiente, analista, inóculo y equipo de laboratorio proporcionen datos confiables y reduzcan el error de los análisis realizados; y establecer la incertidumbre de medición de cada método. Para cada matriz, se cuantificaron coliformes totales y bacterias mesófilas aerobias por duplicado, por tres analistas en cinco niveles de inóculos (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5), y se realizaron tres repeticiones por cada una. La metodología se realizó bajo estadística descriptiva, utilizando Excel. Los datos demostraron que el experimento fue preciso con 98% de confiabilidad. Las diferencias en la repetibilidad y reproducibilidad resultaron menores al 10%, indicando alto grado de concordancia entre los duplicados de muestra y los análisis realizados por diferentes analistas. La incertidumbre expandida evaluada por el método de recuperación fue de 12% para coliformes totales y 11% para bacterias mesófilas aerobias. Se determinó que los resultados obtenidos de los parámetros de desempeño: precisión (reproducibilidad, repetibilidad), veracidad e incertidumbre de medición servirán como medidas de referencia en evaluaciones futuras y que factores externos no influyen negativamente en los resultados emitidos por el LMAZ.

Palabras clave: Incertidumbre, ISO/IEC 17025:2005, parámetros de desempeño, repetibilidad, reproducibilidad, veracidad.

Abstract. The Food Microbiology Laboratory of Zamorano (LMAZ) is under process of accreditation based in the International Standard ISO/IEC 17025:2005, which request verification of the methods uses for assays. The objectives of this study were, verification of performance parameters of the pour plate methods for the quantification of total coliforms and aerobic plate count, in three food matrixes: ground beef, vegetables (canned corn) and milk; proof that external factors such as: environment, analyst, inoculum and laboratory equipment provide reliable data and reduce the error in the analysis for this verification; and establish measurement uncertainty for each method. For every matrix, total coliforms and aerobic plate count were quantified by duplicate, in five levels of inoculum (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 and 10^5) for three analysts, and three repetitions for each. The methodology was based in descriptive statistics, using Excel. The data of the experiment demonstrated that it was precise with 98% of reliability. The differences in the repeatability and reproducibility were less than 10%. These results show high concordance of data in the duplicates of samples and the analysis from different analysts. The expanded uncertainty by the method of recuperation was of 12% for total coliforms and 11% for aerobic plate count. The results obtained by the performance parameters:

precision (reproducibility, repeatability), veracity and measurement of uncertainty will be the base of references measurements in future evaluations and the external factors will not influence negatively in the results reported by LMAZ.

Key words: ISO/IEC 17025:2005, performance parameters, repeatability, reproducibility, uncertainty, veracity.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	6
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4. CONCLUSIONES	23
5. RECOMENDACIONES	24
6. LITERATURA CITADA	25
7. ANEXOS	27

INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Parámetros para la estimación de incertidumbre para métodos microbiológicos. .	5
2. Cantidad de muestras analizadas por matriz de alimentos.	6
3. Formato de criterio de precisión.	9
4. Formato de incertidumbre expandida.	12
5. Valor R^2 obtenido de la regresión lineal entre los recuentos inoculados y recuentos recuperados de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales.	14
6. Repetibilidad de recuentos de bacterias mesófilas aerobias del Analista 1.	15
7. Repetibilidad de recuentos de bacterias mesófilas aerobias del Analista 2.	15
8. Repetibilidad de recuentos de bacterias mesófilas aerobias del Analista 3.	16
9. Repetibilidad de recuentos de coliformes totales del Analista 1.	16
10. Repetibilidad de recuentos de coliformes totales del Analista 2.	17
11. Repetibilidad de recuentos de coliformes totales del Analista 3.	17
12. Reproducibilidad de bacterias mesófilas aerobias por nivel de inóculo y analista.	18
13. Reproducibilidad de coliformes totales por nivel de inóculo y analista.	19
14. Veracidad de bacterias mesófilas aerobias por nivel de inóculo y matriz.	20
15. Veracidad de coliformes totales por nivel de inóculo entre analista y matriz.	21
16. Distribución de la incertidumbre combinada para el método de bacterias mesófilas aerobias.	22
17. Distribución de la incertidumbre combinada para el método de coliformes totales.	22
Anexos	Página
1. Preparación de medios de cultivo: ABRV, ACE y buffer fosfato.	27
2. Registro de preparación de medios de cultivo utilizados.	28
3. Lista de equipos utilizados en la validación.	28
4. Estimación de la incertidumbre para el método de bacterias mesófilas aerobias.	28
5. Estimación de la incertidumbre para el método de coliformes totales.	35

1. INTRODUCCIÓN

El propósito de una validación es establecer una evidencia documentada de un proceso que se realiza bajo rigurosas condiciones, generando un alto grado de confianza en los resultados obtenidos. Para garantizar que los resultados del estudio sobre coliformes totales (CT) y bacterias mesófilas aerobia (BMA) sean válidos, el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ) ha implementado un Sistema de Gestión de la Calidad basado en la Norma Internacional ISO/IEC 17025:2005. “Esta norma internacional establece los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos o de calibraciones, incluido el muestreo” (ISO/IEC 17025:2005). El cumplimiento de los requisitos de calidad y técnicos de esta norma favorece al proceso de acreditación del LMAZ.

Dentro de los requisitos técnicos de la ISO/IEC 17025:2005, se describen factores que determinan exactitud y confiabilidad de los ensayos o de las calibraciones realizadas en un laboratorio. Dentro de los factores se encuentran: el personal, las instalaciones y condiciones ambientales, los métodos de ensayo y de calibración, los equipos, la trazabilidad de las mediciones, el muestreo y la manipulación de los ítems de ensayo y de calibración (ISO/IEC 17025:2005).

De acuerdo con los requisitos técnicos de la norma ISO/IEC 17025:2005, para seleccionar el método acorde al análisis requerido por el cliente, se establecen cuatro opciones: método normalizado, método normalizado modificado, método no normalizado y método desarrollado por el laboratorio. El método normalizado es desarrollado por un organismo de normalización internacional, regional, nacional u organizaciones internacionales reconocidas, cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico correspondiente. El desarrollo del método incluye la etapa de su validación.

Dentro de métodos normalizados se encuentran los métodos publicados por las agencias: “International Organization for Standardization” (ISO), “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”, “Standard Methods for the Examination of Dairy Products”, “American Society for Testing and Material” (ASTM), “Environmental Protection Agency” (EPA), “Official Methods of Analysis” (AOAC), “Food and Drug Administration” (FDA).

El método normalizado modificado debe ser validado, demostrando que no hay repercusión en la calidad de los resultados. El nivel de validación puede aumentar según cambios realizados a la norma. Debe evaluar y notificar cambios mínimos en los requisitos para garantizar calidad en los resultados (ECA 2010).

El método no normalizado es desarrollado por terceros o por modificaciones de un método normalizado, validado. En el caso de modificaciones, es necesario demostrar que éstas no tienen una repercusión negativa en los resultados (ECA 2010). El método desarrollado por el laboratorio permite que cada laboratorio emplee o cree sus propios métodos, sin embargo estos deben ser validados y documentados. Se recomienda utilizar un método normalizado de referencia para garantizar los resultados (OAG 2007).

Dentro del alcance de la acreditación del LMAZ, se han establecido como métodos de ensayo métodos normalizados para la determinación de recuento de bacterias mesófilas aerobias (BMA) por el método de vaciado en placa, FDA (Maturin 2001) y la enumeración de coliformes totales (CT) por el método de vertido en placa, FDA (Feng 2002).

Los coliformes totales son bacterias anaerobias facultativas, Gram negativas, no forman esporas, fermentan lactosa, forman ácido y gas (Feng 2002). Para determinar coliformes totales se utiliza medio selectivo Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV) (Rodríguez 2005). La presencia de coliformes totales en los alimentos indica deficiencia en prácticas de sanidad y un proceso de desinfección incorrecto (Bravo 2004).

Las bacterias mesófilas aerobias son bacterias capaces de formar colonias a temperaturas de 30 – 40 °C; son indicadores de condiciones óptimas de almacenamiento, transporte e información acerca de la vida útil de los alimentos. La determinación de BMA utiliza Agar Cuenta Estándar (ACE) ya que no son bacterias exigentes en necesidades nutricionales (Pascual 2000).

El LMAZ al trabajar con métodos normalizados debe cumplir con los siguientes requisitos:

- Emplear el procedimiento normalizado sin efectuar cambio alguno de la norma o documento de referencia.
- Verificar rigurosamente el método documental y práctico.
- Comparar estadísticamente los parámetros de desempeño del método normalizado versus los parámetros obtenidos.

Los ensayos cuantitativos se encargan de verificar que los métodos normalizados cumplan con los requisitos anteriormente mencionados (ECA 2012).

Para demostrar la validez de los resultados de cada método, el LMAZ debe presentar un plan de validación que garantice la eficacia del método. El plan toma en cuenta tanto las especificaciones como el alcance de la validación. Las especificaciones se basan en los parámetros descritos de precisión, repetibilidad, reproducibilidad, veracidad así como la estimación de la incertidumbre de la medición para cada método. Cuando estas especificaciones no existen, el laboratorio deberá acordarlas con el cliente. El alcance en el método normalizado se refiere al rango de trabajo del método (concentraciones a cuantificar) y matriz alimenticia sobre la que aplica el método (ECA 2010).

El método normalizado se caracteriza por implementar un control de calidad que mantenga la validez del método y permita en el tiempo darle seguimiento. La verificación del método normalizado consiste en evaluar el desempeño, comprobando que los requisitos cumplan con todos los parámetros establecidos en la validación realizada por el LMAZ y puedan ser usados de manera confiable. En las especificaciones del método, el LMAZ realiza la verificación de los métodos normalizados, tomando en cuenta como mínimo los siguientes parámetros de desempeño: precisión (reproducibilidad y repetibilidad), veracidad e incertidumbre de medición.

La precisión es el grado de concordancia entre resultados obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, bajo condiciones específicas (VIM 2008). Repetibilidad y reproducibilidad son condiciones para medir precisión. La reproducibilidad es el grado de concordancia entre resultados obtenidos por diversas condiciones bajo la misma metodología y matrices similares. Existen dos formas de evaluar reproducibilidad; la primera toma en cuenta diferentes tiempos, mismo analista y condiciones. La segunda consideración se caracteriza por utilizar tiempos y condiciones similares pero diferentes analistas (OAG 2007). La repetibilidad es la medida de concordancia que obtiene un analista bajo las mismas condiciones de laboratorio (procedimiento, ambiente, equipo de laboratorio y condiciones de medición) sobre una matriz similar en intervalos de tiempos cortos (ECA 2010).

La veracidad es el grado de concordancia del valor promedio obtenido en el estudio versus un valor de referencia aceptado. Se expresa en forma de sesgo. Según la recuperación a partir de los log UFC/g o mL inoculados se debe realizar una corrección para evaluar veracidad (ECA 2012). Para mayor certeza, se utiliza el Valor $|Z|$ como límite de confirmación en muestras ya establecidas en métodos estándar de productos lácteos como la leche (Wehr 2004).

La evaluación de la incertidumbre es otro de los requisitos básicos para los laboratorios que operan bajo la norma ISO/IEC 17025:2005. La incertidumbre es la medición que estima un rango de los resultados de un análisis, cuya probabilidad o nivel de confianza se encuentren distribuidos normalmente (VIM 2008). Los factores que intervienen en la incertidumbre pueden incluir condiciones de muestreo, preparación y selección de la matriz, calibración del equipo de laboratorio, ambiente y analistas (OAG 2008).

Los laboratorios de ensayo deben tener y deben aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de la medición. El laboratorio debe, por lo menos, tratar de identificar todos los componentes de la incertidumbre y hacer una estimación razonable, y debe asegurarse de que la forma de informar el resultado no dé una impresión equivocada de la incertidumbre. Una estimación razonable se debe basar en un conocimiento del desempeño del método y en el alcance de la medición y debe hacer uso, por ejemplo, de la experiencia adquirida y de los datos de validación anteriores (ISO 2005).

Los componentes de la incertidumbre son cada una de las fuentes individuales de incertidumbre (u) que contribuyen a la variación de los resultados. La incertidumbre combinada (w) de un mensurando es igual a raíz cuadrada positiva de las varianzas o covarianzas de los componentes de la incertidumbre. La incertidumbre expandida (U),

define un intervalo en el que se encuentra el valor del mensurando con un nivel de confianza determinado. El valor de la incertidumbre expandida se puede estimar a partir de la incertidumbre estándar combinada y utilizando un factor de cobertura k . El valor del factor de cobertura dependerá de la probabilidad estadística requerida; para un nivel de confianza de 95%, $k=2$, y para un 99% de confianza, $k=3$ (Corry *et al.* 2007).

Existen dos formas generales de estimar la incertidumbre: A y B. La evaluación de la incertidumbre tipo A se caracteriza por vincularse con medidas estadísticas, se calcula de una serie de n mediciones, y se expresa como la desviación estándar de las mediciones. La evaluación de Tipo B utiliza otros métodos como entidades basadas en estándares internacionales, o asume distribuciones de posibles valores (distribución triangular o rectangular). Ejemplos: incertidumbre de equipos (balanza), especificaciones o tolerancias de material volumétrico. El reporte del cálculo de la incertidumbre debe citar las fuentes de información utilizadas en la estimación de la incertidumbre (Niemelä 2002).

Para la estimación de la incertidumbre en métodos microbiológicos existen algunas metodologías ya aceptadas. La incertidumbre en el área de microbiología puede ser calculada por cuatro métodos los cuales se presentan a continuación:

1. Reproducibilidad de réplicas: Se utilizan las réplicas de reproducibilidad para una misma matriz. Este método se caracteriza por tomar en cuenta diversos factores que se ven envueltos al momento de realizar un análisis como: error de analista, variación en equipo, condiciones ambientales y error aleatorio.
2. Recuperación de réplicas: Este método se caracteriza por usar el porcentaje de recuperación en diferentes tiempos o repeticiones. Ayuda a tomar en cuenta las fuentes de incertidumbre como: error de aleatoriedad, variación entre analistas, calibración de equipos y condiciones ambientales. Este método es uno de los más fáciles ya que únicamente toma en cuenta el porcentaje de recuperación.

Los otros métodos para calcular incertidumbre no son muy recomendados ya que dejan por fuera algunos factores antes mencionados, por ejemplo:

3. Réplicas de platos: Se realizan diluciones de una matriz por analista y esta misma se duplica en otras placas como control.
4. Réplicas verdaderas: Se toma la muestra original, se divide y diluye en dos series independientes por analista, luego se toma solo una serie para realizar el análisis de la muestra (Mettler 2007).

Los factores que toma en cuenta cada método para medir incertidumbre se representan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Parámetros para la estimación de incertidumbre para métodos microbiológicos.

Fuente de incertidumbre	Método			
	Reproducibilidad	Recuperación	Verdadero	Plato
Equipo	√	√	√	√
Analista	√	√	√	√
Error aleatorio	√	√	√	
Erro de conteo	√	√		
Diluciones	√	√		

Fuente: Adaptado del artículo Guidelines for Estimating Uncertainty for Microbiological Counting Methods (Mettler 2007).

√: Cumple con la fuente de incertidumbre.

Los objetivos del estudio fueron verificar los parámetros de desempeño de los métodos de prueba por vertido de placas para la cuantificación de coliformes totales (CT) y bacterias mesófilas aerobias (BMA), en tres matrices alimenticias: carne molida de res, vegetales (maíz dulce enlatado) y leche; comprobar que factores externos como: ambiente, analista, inóculo y equipo de laboratorio proporcionen datos confiables y reduzcan el error de los análisis realizados para la validación; y establecer la incertidumbre de medición de cada método.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras seleccionadas. Las muestras se eligieron al azar, tomando como parámetro alimentos sólidos (maíz dulce enlatado y carne molida de res) y alimentos líquidos (leche).

METODOLOGÍA MICROBIOLÓGICA:

Se utilizó el método de vertido de placa (Pour Plate) para los recuentos de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales, FDA (Maturin 2001).

Número de muestras. El número de muestras utilizadas por matriz (carne molida de res, maíz dulce enlatado y leche), se evaluó con cinco niveles de inóculo por cada analista como se muestra en el Cuadro 2. El análisis se realizó por duplicado de placas tanto para coliformes totales como para bacterias mesófilas aerobias.

Cuadro 2. Cantidad de muestras analizadas por matriz de alimentos.

Nivel de inóculo	Analista			N° total de muestras
	1	2	3	
10 ¹	2	2	2	6
10 ²	3	3	3	9
10 ³	3	3	3	9
10 ⁴	3	3	3	9
10 ⁵	2	2	2	6
Total	13	13	13	39

Preparación del inóculo. Se utilizó un cultivo de *Escherichia coli* (25922, ATCC) de la colección de cepas de referencia del LMAZ que se encontraba en Agar de soya a 4 °C. Se tomó con un hisopo una porción del cultivo y se sembró en 9 mL de caldo universal de pre-enriquecimiento (CUP, 0208412, Becton), luego se incubó a 37 °C por 24 horas (Incubadora, Fisher Scientific®). El proceso a continuación descrito fue realizado dentro de la cámara de flujo laminar, LABCONCO®.

El caldo incubado fue sembrado en Agar Cuenta Estándar (ACE; 105,04B; Neogen) por el método de rayado. Se utilizaron dos asas, con la primera aza esterilizada en Bacteriincinerator*IV (McCormick Scientific®) se tomó una muestra y se colocó en una región del

ACE en forma de rayado. Con la segunda asa, se tomó parte de la muestra del rayado anterior y se procedió a rayar el plato en forma ordenada, dividiendo en tres secciones de tal forma que el crecimiento de las bacterias sea claro; se incubó a 37 °C por 24 horas (Incubadora, Fisher Scientific®). Con un hisopo se tomó una colonia aislada de los platos Petri inoculados y se colocó en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo universal de pre-enriquecimiento, se incubó a 37 °C por 24 horas en incubadora. El cultivo se diluyó decimalmente en buffer de fosfatos para tener niveles de inóculo de 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 UFC/g de muestra.

Preparación de muestras inoculadas para coliformes totales. Se utilizaron tres matrices: carne molida de res (esterilizada a 110 °C/15 min), maíz dulce enlatado Elmigo y leche descremada UHT Sula. Cada matriz se inóculo con 5 niveles de *Escherichia coli* (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 UFC/g). Se realizaron tres repeticiones de los inóculos 10^2 , 10^3 , 10^4 y dos repeticiones de 10^1 y 10^5 por matriz.

Para la matriz líquida (leche) se inóculo 100 mL de muestra con 1 mL en los cinco niveles de inóculo; y para las matrices sólidas (carne molida de res y maíz dulce enlatado) se tomaron 100 g de cada muestra y se inocularon en los cinco niveles en bolsas estériles (SCR-7012, ABT). Una vez inoculado, se llevó al homogeneizador peristáltico (IUL Instruments®) para homogeneizar el inóculo con la muestra por dos minutos.

Luego, se tomó 50 g de la muestra sólida inoculada y se colocó en una bolsa estéril; se agregó 450 mL de buffer fosfato, pH 7.2 y se colocó en el homogeneizador peristáltico por un minuto. En el caso de la matriz líquida se colocó la muestra inoculada en el homogeneizador peristáltico por un minuto, luego se tomó 50 mL de muestra y se le agregó 450 mL de buffer fosfato, pH 7.2 y se llevó al homogeneizador por un minuto.

Con las muestras homogenizadas se realizaron 4 diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) utilizando 10 mL de la muestra diluida y mezclando con 90 mL de buffer fosfato, pH 7.2. Se utilizó el método de vertido de placa para las siembras de cada muestra, se colocó 1 mL de cada dilución por duplicado en platos de Petri estériles y se agregó 15 mL de medio Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV, 9420312, Biomark) a 45 °C. Se esperó tres minutos para solidificar la primera capa de ABRV y a continuación se colocó una segunda capa (Feng 2002). Una vez solidificados los medios, los platos Petri se colocaron en la incubadora a 37 °C por 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación, se realizó el recuento sugerido por el método Aerobic Plate Count, FDA (Maturin 2001).

Preparación de muestras inoculadas para bacterias mesófilas aerobias. Se utilizaron tres matrices: carne molida de res (esterilizada a 110 °C/15 min), maíz dulce enlatado Elmigo y leche descremada UHT Sula. Cada matriz se inóculo con 5 niveles de *Escherichia coli* (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 UFC/g). Se realizaron tres repeticiones de los inóculos 10^2 , 10^3 , 10^4 y dos repeticiones de 10^1 y 10^5 por matriz. Para la matriz líquida (leche) se inóculo 100 mL de muestra con 1 mL en los cinco niveles de inóculo; y para las matrices sólidas (carne molida de res y maíz dulce enlatado) se tomó 100 g de cada muestra y se inóculo en los cinco niveles en bolsas estériles (SCR-7012, ABT). Una vez inoculado se llevó al homogeneizador peristáltico (IUL Instruments®) para homogeneizar el inóculo con la muestra por dos minutos.

Luego, se tomó 50 g de la muestra sólida inoculada y se colocó en una bolsa estéril; se agregó 450 mL de buffer fosfato, pH 7.2 y se colocó en el homogeneizador peristáltico por un minuto. En el caso de la matriz líquida se colocó la muestra inoculada en el homogeneizador peristáltico por un minuto, luego se tomó 50 mL de muestra y se le agregó 450 mL de buffer fosfato, pH 7.2 y se llevó al homogeneizador por un minuto.

Con las muestras homogenizadas se realizaron 4 diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) utilizando 10 mL de la muestra diluida y mezclando con 90 mL de buffer fosfato, pH 7.2. Se utilizó el método de vertido de placa para las siembras de cada muestras, se colocó 1 mL de cada dilución por duplicado en platos Petri estériles y se agregó 15 mL de medio Agar Cuenta Estándar (ACE, 105,048B, Neogen, 8380312, Biomark). Se esperó tres minutos para que el medio se solidificara. Una vez solidificado el medio, se colocó los platos Petri en la incubadora a 37 °C por 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación, se realizó el recuento sugerido por el método Aerobic Plate Count, FDA (Maturin 2001).

Preparación de muestras control inoculadas. En 100 mL de buffer fosfato, pH 7.2 se agregó 1 mL de cada nivel de inóculo. Las muestras control fueron diluidas y sembradas en ACE y ABRV como se describió anteriormente.

Preparación de placas para control de medio. Para controlar la esterilidad del medio, se vertió 15mL de medio VRBA y ACE en placas Petri individuales. Se incubó a 37 °C por 24 y 48 horas respectivamente.

Recuento y registro de colonias UFC/g o UFC/mL. Para reportar UFC/g o mL se utilizó la siguiente Ecuación 1:

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2)] \times (d)} \quad [1]$$

Dónde:

N = Número de colonias por g o mL de producto.

$\sum C$ = Suma de todas las colonias sobre todos los platos contados.

n_1 = Número de platos en la primera dilución contada.

n_2 = Número de platos en la segunda dilución contada.

d = Dilución de la que se obtuvieron los primeros recuentos.

Para determinar el número de colonias se elevó al inmediato superior, si el tercer dígito es 6, 7, 8 o 9. Se redondeó hacia abajo, cuando el tercer dígito es 1, 2, 3, o 4. Cuando el tercer dígito es 5, se redondeó al inmediato superior cuando el segundo dígito es impar y se redondeó hacia abajo cuando el segundo dígito es par (Maturin 2001).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Recuperación. Se calculó el porcentaje de recuperación del inóculo de acuerdo al método descrito por (Mettler 2007). Se utilizó una hoja de cálculo de Excel para la estimación del porcentaje de recuperación y establecimiento de los límites de control. El porcentaje de recuperación se calculó mediante la Ecuación 2:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Log UFC/g recuperado}}{\text{Log UFC/g inoculado}} \times 100 \text{ [2]}$$

Para determinar lo recuperado a partir de la desviación estándar se calculó mediante la Ecuación 3:

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{Desviación Estándar}}{\text{Promedio}} \times 100 \text{ [3]}$$

Precisión. La precisión es un criterio que se obtiene al analizar por analista los datos por duplicado de platos. Para calcular la precisión se siguió el método descrito en “Standard Methods for Examination of Water and Wastewater”.

Brevemente,

- 1) Se tomó los datos del duplicado de platos para cada muestra y se transformó a logaritmo.
- 2) Se restó los dos logaritmos obtenidos (rango de logaritmo) y se realizó una sumatoria de todos los rangos, se dividió para la cantidad de muestras o platos y se obtuvo el rango de los logaritmos (\bar{R}).
- 3) El criterio de precisión se obtuvo multiplicando la constante 3.27 por rango de los logaritmos (\bar{R}).

Ejemplo:

Cuadro 3.Formato de criterio de precisión.

N° de Muestra	Analista	Duplicado 1 (D1)	Duplicado 2 (D2)	Log D1 (L1)	Log D2 (L2)	R _{Log} (L1-L2)
1	1	44000	46000	4.6435	4.662758	0.019305
2	1	62000	54000	4.7924	4.732394	0.059998
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
14	1	640	400	2.8062	2.60206	0.204120
15	1	50	50	1.6990	1.69897	0.000000
16	1	3900	3400	3.5911	3.531479	0.059586

$$\text{Sumatoria de } R_{\text{Log}} = 0.019305 + 0.059998 + \dots + \dots + \dots + 0.204120 + 0.000000 + 0.59586 \\ = 1.3193$$

Ecuación 4.

$$\bar{R} = \frac{\text{Sum } R_{\text{Log}}}{n} = \frac{1.3193}{16} = 0.0824 \text{ [4]}$$

$$\text{Criterio de precisión (Ecuación 5)} = 3.27 \times \bar{R} = 3.27 (0.0824) = 0.26906 \text{ [5]}$$

Valor |Z|. Para establecer un valor de referencia (valor Z), se estima que el procedimiento usado determine un límite de referencia para productos de maíz dulce enlatado y carne molida de res. Para calcular el valor Z se utilizó la Ecuación 6 (AOAC, 2004):

$$Z = (x - X) / SD \text{ [6]}$$

Dónde:

Z: valor Z

x: valor reportado

X: valor asignado

SD: desviación estándar

El valor Z es interpretado de la siguiente manera;

$$\begin{aligned} |Z| \leq 2 & \text{ Satisfactorio} \\ 2 < |Z| < 3 & \text{ Cuestionable} \\ |Z| \geq 3 & \text{ Insatisfactorio} \end{aligned}$$

Incertidumbre. Se identificaron los componentes de la incertidumbre utilizando un diagrama de Ishikawa. Una vez identificadas las fuentes de incertidumbre se evaluaron de manera individual considerando las evaluaciones de tipo A y B (Niemelä 2002), así como el rango de variabilidad (tolerancia) de los instrumentos de laboratorio declarados por el fabricante y que fueron utilizados en el estudio:

$$\begin{aligned} \text{Pipeta 5 mL} & \pm 0.5 \text{ mL} \\ \text{Probeta 100 mL} & \pm 0.15 \text{ mL} \\ \text{Probeta 500 mL} & \pm 5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Para estimar la incertidumbre de los instrumentos de medición de volumen se utilizó una evaluación tipo B, con distribución triangular, usando la Ecuación 7:

$$u = \frac{a}{\sqrt{3}} \text{ [7]}$$

Siendo:

u: Incertidumbre

a: Rango de variabilidad (tolerancia declarada por el fabricante)

Ejemplo:

$$u_{100\text{mL}} = \frac{0.5}{\sqrt{3}} = 0.2886 \text{ mL}$$
$$u_{5\text{mL}} = \frac{0.15}{\sqrt{3}} = 0.0866 \text{ mL}$$
$$u_{500\text{mL}} = \frac{5}{\sqrt{3}} = 2.8867 \text{ mL}$$

Una vez calculado este valor se debe dividir para la cantidad de volumen que se utilizó con cada instrumento, obteniendo así el valor de incertidumbre estándar relativa (RSU) que se representa por la letra w .

Ejemplo:

$$w_{50 \text{ mL}} = \frac{0.2886}{50} = 0.0057$$
$$w_{90 \text{ mL}} = \frac{0.2886}{90} = 0.0032$$
$$w_{10 \text{ mL}} = \frac{0.0866}{10} = 0.0086$$
$$w_{450 \text{ mL}} = \frac{2.8867}{450} = 0.0064$$

Una vez obtenido el valor RSU se procede a calcular el valor de incertidumbre estándar relativa (RSU) por dilución (Ecuación 8).

$$w_f^2 = \frac{u_b^2 + b^2 w_a^2}{(a+b)^2} \quad [8]$$

Siendo:

w_f^2 : RSU de dilución.

u_b^2 : Incertidumbre de volumen del diluyente

b : Volumen del diluyente

w_a^2 : RSU de alícuota

a : Volumen de alícuota

Cálculo incertidumbre total de diluciones (Ecuación 9):

$$w_F^2 = w_{f-1}^2 + w_{f-2}^2 + w_{f-3}^2 \quad [9]$$

Siendo:

w_F^2 : Incertidumbre total de diluciones

w_{f-1}^2 : Incertidumbre dilución 10^{-1}

w_{f-2}^2 : Incertidumbre dilución 10^{-2}

w_{f-3}^2 : Incertidumbre dilución 10^{-3}

Una vez realizado el cálculo de incertidumbre total de diluciones se puede proceder al cálculo de la incertidumbre total de equipos y conteo.

Para obtener la incertidumbre combinada del método se partió de la Ecuación 10:

$$y = Fc \text{ [10]}$$

Dónde:

y: Concentración de células (UFC/g o UFC/mL)

F: Factor de dilución

c: Conteo de colonias en el plato Petri

A continuación se presenta la incertidumbre total (Ecuación 11):

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2 \text{ [11]}$$

$\sum w^2$ = Incertidumbre total

w_F^2 = Incertidumbre total de diluciones

w_C^2 = Incertidumbre conteo

Para estimar la incertidumbre del conteo, se utilizó el método de recuperación de muestras inoculadas.

La incertidumbre se calculó de la siguiente manera:

Primero se debe tomar los datos del total de recuentos en UFC y transformarlos a logaritmo, se transforma a logaritmo ya que existe un rango de valores muy altos o muy bajos en los datos reportados en UFC, por lo cual al ser graficados se tiene un sesgo mayor hacia los lados ya sea derecho o izquierdo; cuando los datos son transformados a logaritmo se obtiene una gráfica con distribución normal (Greenberg 1992).

Cuadro 4. Formato de incertidumbre expandida.

Resultado		U expandida	Lim Inferior	Lim Superior	U _{UFC/g o mL}	
UFC	Log UFC	Log UFC × 0.072	Log UFC - U exp	Log UFC + U exp	10 ^{Lim inf U}	10 ^{Lim sup U}
20000	4.3010	0.3097	3.9914	4.6107	9802.9	40804.1
12000	4.0792	0.2937	3.7855	4.3729	6102.1	23598.4
--	--	--	--	--	--	--
--	--	--	--	--	--	--
100	2.0000	0.1440	1.8560	2.1440	71.8	139.3
1600	3.2041	0.2307	2.9734	3.4348	940.6	2721.6
110	2.0414	0.1470	1.8944	2.1884	78.4	154.3
150	2.1761	0.1567	2.0194	2.3328	104.6	215.2

Se debe calcular el valor recuperado, el cual se obtiene del conteo de placas inoculadas versus el conteo de placas analizadas. Se debe calcular la desviación estándar (SD) del porcentaje de recuperación. En este ejemplo la desviación es de 3.6%. Esta desviación

estándar es un estimado de la incertidumbre combinada. Se realizó una hoja de Excel la cual facilita el cálculo del rango de incertidumbre al solo ingresar el resultado del conteo en UFC; para validar esta hoja se realizó todos los cálculos de forma manual.

Una vez obtenida la incertidumbre combinada del método, se estima el porcentaje que aporta cada componente de la incertidumbre.

- Incertidumbre de diluciones (Ecuación 12):

$$w_F^2 = \frac{w_F^2 * 100}{\sum w^2} [12]$$

- Incertidumbre de conteo (Ecuación 13):

$$w_C^2 = \frac{w_C^2 * 100}{\sum w^2} [13]$$

El valor de la incertidumbre expandida se estimó a partir de la incertidumbre estándar combinada y utilizando un factor de cobertura $k=2$ (Corry *et al.* 2007).

Para reportar la incertidumbre de la medición en relación con los resultados expresados en UFC/g o UFC/mL de muestra se requiere hacer una conversión de unidades. Puesto que la recuperación esta expresada en %, cuando se calcule la incertidumbre de una muestra en particular, se requiere multiplicar el % de la incertidumbre por el valor del resultado expresado el Log_{10} para estimar la incertidumbre en unidades logarítmicas, y luego convertir a UFC/g o mL de muestra.

Por ejemplo:

$$150 \text{ UFC: } 150 \text{ en } \log_{10} = 2.1761$$

La incertidumbre expandida en logaritmos es de $2.1761 \times 0.072 = 0.1567$

Como la incertidumbre es un rango se debe sumar y restar la incertidumbre expandida al resultado en logaritmo del conteo.

Por ejemplo:

$$\begin{aligned} 2.1761 + 0.1567 &= 2.3328 \\ 2.1761 - 0.1567 &= 2.0194 \end{aligned}$$

Una vez realizado el cálculo del rango se debe colocar nuevamente los datos en UFC.

Por ejemplo:

$$\begin{aligned} 10^{2.3328} &= 215.2 \\ 10^{2.0194} &= 104.6 \end{aligned}$$

Por lo tanto el rango de incertidumbre para 150 UFC se encuentra entre 105 y 215 UFC.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos obtenidos entre el valor inoculado (variable independiente) *versus* log recuperados (variable dependiente) de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales son confiables, ya que el coeficiente de determinación (R^2) obtenido por cada analista es > 95%, indicando que los datos se ajustaron al modelo lineal.

Cuadro 5. Valor R^2 obtenido de la regresión lineal entre los recuentos inoculados y recuentos recuperados de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales.

Analistas	Método	
	Bacterias mesófilas aerobias	Coliformes totales
1	0.9777	0.9502
2	0.9839	0.9542
3	0.9815	0.9538

Los resultados (Cuadro 4 y 5) representan la repetibilidad tomando en cuenta como parámetro de desempeño la precisión del experimento realizado por cada analista. El parámetro para evaluar la precisión es de 15 o más muestras. Para que exista aceptación en el estudio, el rango de logaritmo debe ser menor o igual al criterio de precisión establecido en el 90% de los datos. Si el rango de logaritmo es mayor al criterio de precisión indica que los valores no son aceptados (Greenberg 1992). Los datos representados en los (Cuadros 4, 5, 6, 7, 8 y 9) indican que son aceptables en el 99% del total de las muestras.

Cuadro 6. Repetibilidad de recuentos de bacterias mesófilas aerobias del Analista 1.

Analista	(D1) ^μ	(D2) ^ξ	(L1) ^π	(L2) ^ω	(L1-L2) ^α	Valor Abs	A/NA	Criterio precisión
1	38000	42000	4.580	4.623	-0.043	0.043	A ^β	0.262
	40000	40000	4.602	4.602	0.000	0.000	A	
	650000	500000	5.813	5.699	0.114	0.114	A	
	6100	6000	3.785	3.778	0.007	0.007	A	
	51000	74000	4.708	4.869	-0.162	0.162	A	
	380	460	2.580	2.663	-0.083	0.083	A	
	5400	5200	3.732	3.716	0.016	0.016	A	
	700	660	2.845	2.820	0.026	0.026	A	
	480000	600000	5.681	5.778	-0.097	0.097	A	
	80	50	1.903	1.699	0.204	0.204	A	
	66000	54000	4.820	4.732	0.087	0.087	A	
	90	120	1.954	2.079	-0.125	0.125	A	
	260000	200000	5.415	5.301	0.114	0.114	A	
	510	460	2.708	2.663	0.045	0.045	A	
	70	60	1.845	1.778	0.067	0.067	A	
5300	4300	3.724	3.633	0.091	0.091	A		

^β A: Aceptable / NA: No aceptable.^μ D1: Duplicado 1 / ^ξ D2: Duplicado 2^π L1: Log D1 / ^ω L2: Log D2^α L1-L2: Diferencia logarítmica

Cuadro 7. Repetibilidad de recuentos de bacterias mesófilas aerobias del Analista 2.

Analista	(D1) ^μ	(D2) ^ξ	(L1) ^π	(L2) ^ω	(L1-L2) ^α	Valor Abs	A/NA	Criterio precisión
2	35000	33000	4.544	4.519	0.026	0.026	A ^β	0.292
	43000	80000	4.633	4.903	-0.270	0.270	A	
	520000	550000	5.716	5.740	-0.024	0.024	A	
	5500	5700	3.740	3.756	-0.016	0.016	A	
	66000	50000	4.820	4.699	0.121	0.121	A	
	440	360	2.643	2.556	0.087	0.087	A	
	5300	5200	3.724	3.716	0.008	0.008	A	
	700	610	2.845	2.785	0.060	0.060	A	
	480000	510000	5.681	5.708	-0.026	0.026	A	
	30	70	1.477	1.845	-0.368	0.368	NA	
	53000	52000	4.724	4.716	0.008	0.008	A	
	70	100	1.845	2.000	-0.155	0.155	A	
	208000	196000	5.318	5.292	0.026	0.026	A	
	480	420	2.681	2.623	0.058	0.058	A	
	60	50	1.778	1.699	0.079	0.079	A	
4900	3900	3.690	3.591	0.099	0.099	A		

^β A: Aceptable / NA: No aceptable.^μ D1: Duplicado 1 / ^ξ D2: Duplicado 2^π L1: Log D1 / ^ω L2: Log D2^α L1-L2: Diferencia logarítmica.

Cuadro 8. Repetibilidad de recuentos de bacterias mesófilas aerobias del Analista 3.

Analista	(D1) ^μ	(D2) ^ξ	(L1) ^π	(L2) ^ω	(L1-L2) ^α	Valor Abs	A/NA	Criterio Precisión
3	39000	37000	4.591	4.568	0.023	0.023	A ^β	0.272
	41000	39000	4.613	4.591	0.022	0.022	A	
	540000	590000	5.732	5.771	-0.038	0.038	A	
	5700	5500	3.756	3.740	0.016	0.016	A	
	52000	37000	4.716	4.568	0.148	0.148	A	
	500	390	2.699	2.591	0.108	0.108	A	
	5000	5800	3.699	3.763	-0.064	0.064	A	
	640	780	2.806	2.892	-0.086	0.086	A	
	540000	480000	5.732	5.681	0.051	0.051	A	
	50	80	1.699	1.903	-0.204	0.204	A	
	63000	53000	4.799	4.724	0.075	0.075	A	
	120	90	2.079	1.954	0.125	0.125	A	
	230000	270000	5.362	5.431	-0.070	0.070	A	
	470	530	2.672	2.724	-0.052	0.052	A	
	90	70	1.954	1.845	0.109	0.109	A	
	3700	5100	3.568	3.708	-0.139	0.139	A	

^β A: Aceptable / NA: No aceptable.^μ D1: Duplicado 1 / ^ξ D2: Duplicado 2^π L1: Log D1 / ^ω L2: Log D2^α L1-L2: Diferencia logarítmica.

Cuadro 9. Repetibilidad de recuentos de coliformes totales del Analista 1.

Analista	(D1) ^μ	(D2) ^ξ	(L1) ^π	(L2) ^ω	(L1-L2) ^α	Valor Abs	A/NA	Criterio Precisión
1	44000	46000	4.643	4.663	-0.019	0.019	A ^β	0.270
	62000	54000	4.792	4.732	0.060	0.060	A	
	530000	620000	5.724	5.792	-0.068	0.068	A	
	4700	5000	3.672	3.699	-0.027	0.027	A	
	52000	66000	4.716	4.820	-0.104	0.104	A	
	570	450	2.756	2.653	0.103	0.103	A	
	6000	5300	3.778	3.724	0.054	0.054	A	
	660	690	2.820	2.839	-0.019	0.019	A	
	660000	500000	5.820	5.699	0.121	0.121	A	
	40	30	1.602	1.477	0.125	0.125	A	
	50000	54000	4.699	4.732	-0.033	0.033	A	
	40	70	1.602	1.845	-0.243	0.243	A	
	178000	214000	5.250	5.330	-0.080	0.080	A	
	640	400	2.806	2.602	0.204	0.204	A	
	50	50	1.699	1.699	0.000	0.000	A	
	3900	3400	3.591	3.531	0.060	0.060	A	

^β A: Aceptable / NA: No aceptable.^μ D1: Duplicado 1 / ^ξ D2: Duplicado 2^π L1: Log D1 / ^ω L2: Log D2^α L1-L2: Diferencia logarítmica.

Cuadro 10. Repetibilidad de recuentos de coliformes totales del Analista 2.

Analista	(D1) ^μ	(D2) ^ξ	(L1) ^π	(L2) ^ω	(L1-L2) ^α	Valor Abs	A/NA	Criterio Precisión
2	45000	42000	4.653	4.623	0.030	0.030	A ^β	0.413
	50000	57000	4.699	4.756	-0.057	0.057	A	
	490000	600000	5.690	5.778	-0.088	0.088	A	
	4200	4200	3.623	3.623	0.000	0.000	A	
	67000	50000	4.826	4.699	0.127	0.127	A	
	390	460	2.591	2.663	-0.072	0.072	A	
	5400	5900	3.732	3.771	-0.038	0.038	A	
	630	710	2.799	2.851	-0.052	0.052	A	
	520000	63000	5.716	4.799	0.917	0.917	A	
	40	30	1.602	1.477	0.125	0.125	A	
	48000	55000	4.681	4.740	-0.059	0.059	A	
	70	40	1.845	1.602	0.243	0.243	A	
	197000	211000	5.294	5.324	-0.030	0.030	A	
	640	550	2.806	2.740	0.066	0.066	A	
	50	60	1.699	1.778	-0.079	0.079	A	
	3300	3600	3.519	3.556	-0.038	0.038	A	

^β A: Aceptable / NA: No aceptable.^μ D1: Duplicado 1 / ^ξ D2: Duplicado 2^π L1: Log D1 / ^ω L2: Log D2^α L1-L2: Diferencia logarítmica.

Cuadro 11. Repetibilidad de recuentos de coliformes totales del Analista 3.

Analista	(D1) ^μ	(D2) ^ξ	(L1) ^π	(L2) ^ω	(L1-L2) ^α	Valor Abs	A/NA	Criterio Precisión
3	45000	45000	4.653	4.653	0.000	0.000	A ^β	0.235
	60000	55000	4.778	4.740	0.038	0.038	A	
	520000	590000	5.716	5.771	-0.055	0.055	A	
	4900	4900	3.690	3.690	0.000	0.000	A	
	51000	66000	4.708	4.820	-0.112	0.112	A	
	530	470	2.724	2.672	0.052	0.052	A	
	5300	5900	3.724	3.771	-0.047	0.047	A	
	700	680	2.845	2.833	0.013	0.013	A	
	660000	800000	5.820	5.903	-0.084	0.084	A	
	30	40	1.477	1.602	-0.125	0.125	A	
	43000	48000	4.633	4.681	-0.048	0.048	A	
	70	40	1.845	1.602	0.243	0.243	NA	
	200000	170000	5.301	5.230	0.071	0.071	A	
	560	640	2.748	2.806	-0.058	0.058	A	
	50	70	1.699	1.845	-0.146	0.146	A	
	3800	3300	3.580	3.519	0.061	0.061	A	

^β A: Aceptable / NA: No aceptable.^μ D1: Duplicado 1 / ^ξ D2: Duplicado 2^π L1: Log D1 / ^ω L2: Log D2^α L1-L2: Diferencia logarítmica.

La reproducibilidad se evaluó tomando en cuenta parámetros similares como ambiente, matriz e inóculo, pero diferentes analistas. Los datos obtenidos en los cuadros 10 y 11 muestran que la reproducibilidad es confiable ya que el RSD aceptable entre analistas debe ser menor o igual a 10% en el 90% de los datos (Wehr 2004).

Cuadro 12. Reproducibilidad de bacterias mesófilas aerobias por nivel de inóculo y analista.

Nivel de Inoculo	Bacterias mesófilas aerobias (Log UFC/g)			
	Analista	Promedio	SD ^σ	RSD [∞]
10 ¹	1	1.814	0.163	8.982
	2	1.858	0.063	3.431
	3	1.871	0.082	4.402
10 ²	1	2.748	0.162	5.899
	2	2.619	0.298	11.388
	3	2.713	0.079	2.911
10 ³	1	3.728	0.076	2.051
	2	3.733	0.236	6.345
	3	3.655	0.071	1.954
10 ⁴	1	4.588	0.110	2.407
	2	4.635	0.196	4.240
	3	4.683	0.058	1.237
10 ⁵	1	5.491	0.268	4.896
	2	5.717	0.064	1.129
	3	5.525	0.258	4.673

^σ Desviación estándar, raíz cuadrada de la varianza.

[∞] Desviación estándar relativa, desviación estándar dividida para el promedio por cien.

Cuadro 13. Reproducibilidad de coliformes totales por nivel de inóculo y analista.

Nivel de Inoculo	Coliformes totales (Log UFC/g)			
	Analista	Promedio	SD ^σ	RSD [∞]
10 ¹	1	1.946	0.188	9.675
	2	1.826	0.068	3.751
	3	1.642	0.138	8.452
10 ²	1	2.774	0.073	2.636
	2	2.765	0.054	1.959
	3	2.694	0.184	6.840
10 ³	1	3.650	0.087	2.394
	2	3.658	0.228	6.255
	3	3.681	0.129	3.524
10 ⁴	1	4.664	0.097	2.095
	2	4.588	0.309	6.753
	3	4.573	0.187	4.091
10 ⁵	1	5.571	0.413	7.419
	2	5.755	0.010	0.187
	3	5.508	0.293	5.326

^σ Desviación estándar, raíz cuadrada de la varianza.

[∞] Desviación estándar relativa, desviación estándar dividida para el promedio por cien.

Los métodos de pruebas microbiológicas en la leche presentes en cuadro 12 y 13, establecen un criterio de desempeño según el nivel de logaritmo de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales (Wehr 2004). Para brindar certeza de los datos, en el caso de la leche se comprobó mediante el cálculo del Valor $|Z|$; siendo sus parámetros: $|Z| \leq 2$ es satisfactorio, si $2 < |Z| < 3$ es cuestionable y si $|Z| \geq 3$ es insatisfactorio (AOAC, 2004). Sin embargo, para carne molida de res y maíz dulce enlatado el límite permitido se estableció en base al RSD obtenido en el estudio ya que no existe referencia acerca de las matrices mencionadas y se concluye que el valor obtenido puede servir como referencia para futuros experimentos.

Cuadro 14. Veracidad de bacterias mesófilas aerobias por nivel de inóculo y matriz.

Matriz	Bacterias Mesófilas aerobias (Log UFC/g)					Valor Z
	Nivel de Inoculo	Promedio	SD ^σ	RSD [∞]	Criterio de desempeño	
Carne	10 ¹	1.807	0.081	4.471	4.471 [‡]	
	10 ²	2.491	0.167	6.693	6.693	
	10 ³	3.554	0.100	2.800	2.800	
	10 ⁴	4.467	0.185	4.140	4.140	
	10 ⁵	5.318	0.065	1.214	1.214	
Leche	10 ¹	1.934	0.066	3.414	3.414	
	10 ²	2.723	0.041	1.503	5.7 ± 3.1 ^μ	1.08
	10 ³	3.745	0.055	1.458	4.6 ± 1.2	1.28
	10 ⁴	4.760	0.031	0.656	1.4 ± 0.4	6.01
	10 ⁵	5.730	0.028	0.485	3.6 ± 1.6	1.45
Maíz	10 ¹	1.881	0.114	6.042	6.042	
	10 ²	2.859	0.040	1.399	1.399	
	10 ³	3.798	0.090	2.359	2.359	
	10 ⁴	4.630	0.078	1.683	1.683	
	10 ⁵	5.681	0.042	0.736	0.736	

[‡] Criterio establecido con los resultados de la validación del método por el LMAZ.

^μ Criterio establecido por Standard Methods for Examination of Dairy Products (Wehr 2004)

^σ Desviación estándar, raíz cuadrada de la varianza.

[∞] Desviación estándar relativa, desviación estándar dividida para el promedio por cien.

Cuadro 15. Veracidad de coliformes totales por nivel de inóculo entre analista y matriz.

Matriz	Coliformes totales (Log UFC/g)					
	Nivel de Inoculo	Promedio	SD ^σ	RSD [∞]	Criterio de desempeño	Valor Z
Carne	10 ¹	1.679	0.147	8.773	8.773 [¥]	
	10 ²	2.533	0.190	7.485	7.485	
	10 ³	3.504	0.086	2.451	2.451	
	10 ⁴	4.474	0.231	5.164	5.164	
	10 ⁵	5.296	0.036	0.687	0.687	
Leche	10 ¹	1.803	0.069	3.837	7.1 ± 3.1 ^μ	0.44
	10 ²	2.699	0.089	3.307	9.8 ± 3.3	0.91
	10 ³	3.722	0.073	1.971	1.971	
	10 ⁴	4.713	0.094	2.000	5.6 ± 2.9	1.83
	10 ⁵	5.736	0.017	0.298	0.298	
Maíz	10 ¹	1.903	0.182	9.544	9.544	
	10 ²	2.844	0.011	0.402	0.402	
	10 ³	3.785	0.051	1.356	1.356	
	10 ⁴	4.696	0.063	1.341	1.341	
	10 ⁵	5.768	0.050	0.862	0.862	

[¥] Criterio establecido con los resultados de la validación del método por el LMAZ.

^μ Criterio establecido por Standard Methods for Examination of Dairy Products (Wehr 2004).

^σ Desviación estándar, raíz cuadrada de la varianza.

[∞] Desviación estándar relativa, desviación estándar dividida para el promedio por cien.

En los cuadros 14 y 15 se observa que el mayor porcentaje de incertidumbre se encuentra en el conteo del analista ya que es la mayor variación en el estudio con más del 99% de incertidumbre; razón por la cual se considera que la incertidumbre aportada por los equipos es despreciable. En los anexos 4 y 5 se presentan los cálculos de incertidumbre únicamente por conteo de placas. Para objeto del reporte de la incertidumbre expandida, se aplicó el factor de cobertura $k=2$ (nivel de confianza del 95%) (Corry *et al.* 2007), obteniendo para las bacterias mesófilas aerobias 11% de incertidumbre expandida y 12% para coliformes totales.

Cuadro 16. Distribución de la incertidumbre combinada para el método de bacterias mesófilas aerobias.

Componente de la incertidumbre	Valor de la incertidumbre	% de aportación a la incertidumbre combinada
Incertidumbre conteo	0.05508	99.51
Incertidumbre equipos	0.00027	0.49
TOTAL	0.04435	100.00

Cuadro 17. Distribución de la incertidumbre combinada para el método de coliformes totales.

Componente de la incertidumbre	Valor de la incertidumbre	% de aportación a la incertidumbre combinada
Incertidumbre conteo	0.06077	99.56
Incertidumbre equipos	0.00027	0.44
TOTAL	0.06104	100.00

4. CONCLUSIONES

- Se comprobó que el laboratorio puede emitir resultados confiables para futuras evaluaciones por el método de vertido de placas para bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales.
- Se verificó que los factores externos como: ambiente, analista (capacitado por un experto), inóculo y equipo de laboratorio no influyeron de manera negativa al momento de realizar el análisis.
- Se estableció una incertidumbre expandida de 0.11 y 0.12 para bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales, respectivamente, con 95% de confiabilidad.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar verificaciones periódicas mediante un control de calidad utilizando el mismo método para las bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales que permitan generar mayor confiabilidad del método utilizado, y de esta forma contribuyan con el proceso de acreditación del LMAZ.
- Realizar experimentos futuros para estimar un criterio de desempeño (parámetro permitido de acuerdo al nivel de logaritmo de las bacterias) en las muestras de carne molida de res, maíz dulce enlatado y expandir en el área de vegetales.
- El Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano desde la fecha deberá registrarse por los datos y parámetros establecidos mediante este estudio.
- Realizar pruebas interlaboratorio para comparar parámetros establecidos en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos.

6. LITERATURA CITADA

Aguilera, J. 1999. Microstructural principles of food processing and engineering. *In*: Stanley, D. (ed.). Microstructural components and food assemblies. Gaithersburg, Maryland, Aspen Publishers. p 156-162.

AOAC (association of analytical communities) INTERNACIONAL. 2004. Guidelines for laboratories performing microbiological and chemical analyses of food and pharmaceuticals. ISO/IEC 17025:1999. 57: 42-43.

AOAC (association of analytical communities) sec. 966.23. 2001. Bacteriological analytical manual. *In*: Maturin, L. y Peeler, J.T. (ed). Aerobic plate count.

Bravo, F. 2004. El manejo higiénico de los alimentos: Guía para la obtención del distintivo H. s.e. México DF, México, Limusa. p 99.

Corry, Janet E. L., J. Basil, S. Passmore, A. Hedges. 2007. A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. *Food Microbiology* 24: 230-25.

ECA (Ente costarricense de acreditación). 2010. Guía para la validación de métodos V02 (en línea). Consultado el 20 agosto del 2013. Disponible en <http://eca.or.cr/docs.php?c=26&t=SGC>

ECA (Ente costarricense de acreditación). 2012. Política de validación de métodos V02 (en línea). Consultado el 25 agosto del 2013. Disponible en <http://eca.or.cr/docs.php?c=26&t=SGC>

Feng, P., S. Weagant, M. Grant, and W. Burkhardt. 2002. Bacteriological analytical manual: Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform Bacteria (en línea). Consultado el 30 agosto del 2013. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm#shellfish>.

Greenberg, A. E., L.S. Clesceri, and A. D. Eaton. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18 ed. Washington DC, USA, American Public Health Association (APHA). Part 9000. 9020.

ISO (Organización Internacional para Estandarización). 2005. Norma Internacional: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. ISO/IEC 17025. 30 p.

Maturin, L. and J. Peeler. 2001. Bacteriological analytical manual: Aerobic plate count (en línea). Consultado el 02 septiembre del 2013. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>

Mettler, D. and D. Tholen. 2007. Guidelines for Estimating Uncertainty for Microbiological Counting Methods. The American Association for Laboratory Accreditation G (108): 1-8.

Niemelä, S. I. 2002. Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Mittatekniikan keskus. Finland. Advisory commission for metrology. p. 1-77.

OAG (Oficina de acreditación Guatemala). 2007. Política de selección y validación de métodos de ensayo (en línea). Consultado el 03 de septiembre del 2013. Disponible en <http://oga.org.gt/images/files/File/OGA-GEC-016.pdf>.

OAG (Oficina de acreditación Guatemala). 2008. Política de selección y validación de métodos de ensayo (en línea). Consultado el 03 de septiembre del 2013. Disponible en <http://www.oga.org.gt/images/files/File/OGA-GLE-019.pdf>

Pascual, M. y V. Calderón. 2000. Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. 2 ed. Madrid, España, Díaz de Santos. p. 13

Pouch, F. and K. Ito. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of food. 4 ed. American Public Health Association (APHA). Washington, DC. p. 69-80.

Rodriguez, E., M. Gamboa, F. Hernández, y J. García. 2005. Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio. s.e. Editorial Universidad de Costa Rica. 475 p.

Romero, R. 2007. Microbiología y parasitología humana. 3 ed. México D.F, México, Médica Panamericana. p. 753

VIM (International vocabulary of metrology). 2008. International vocabulary of metrology: basic and general concepts and associated terms. 3 ed. 91 p.

Wehr, H. Michael and F. Frank Joseph. 2004. Standard methods for the examination of dairy products. 17 ed. Washington DC, USA, American Public Health Association (APHA). p. 11

7. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medios de cultivo: ABRV, ACE y buffer fosfato.

Preparación de medio Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV) para coliformes totales. Para la preparación de 1 L medio Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV), se mezclaron 41.53 g de medio (VRBA, 8420312, Biomark) con 1000 ml de agua destilada en un matraz Erlen Meyer hasta lograr una homogeneidad con movimiento usando Agitador/Calentamiento, IKA. Se corrigió el pH de 7.4 ± 0.2 con el Potenciómetro, Thermo Scientific® y se cubrió la boca del matraz con papel aluminio para posterior calentar el medio del cultivo a ebullición hasta obtener un medio totalmente disuelto. Finalmente, se colocó 100 mL medio (ABRV, 8420312, Biomark) en frascos de vidrio estériles a baño maría en Termobaño, Thermo Scientific®. ABRV no necesita ser esterilizado y se debe usar el mismo día de elaboración.

Preparación de medio Agar Cuenta Estándar (ACE) para bacterias mesófilas aerobias. Para la preparación de 1 L medio Agar Cuenta Estándar (ACE), se mezclaron 23.5 g de medio (ACE; 105,048B; Neogen) con 1000 mL de agua destilada en un matraz Erlen Meyer hasta lograr una homogeneidad con movimiento usando Agitador/Calentamiento, IKA. Se corrigió el pH de 7.0 ± 0.2 con el Potenciómetro, Thermo Scientific® y se cubrió la boca del matraz con papel aluminio para posterior calentar el medio de cultivo a ebullición hasta obtener un medio totalmente disuelto. Se distribuyó en volúmenes de 100 mL en frascos de vidrio de capacidad de 250 mL. Finalmente, se esterilizó el medio a 121°C por 15 minutos en Autoclave horizontal, Sterimatic Maket Forge®. El medio de cultivo fue atemperado a $45^{\circ} \text{C} \pm 1.00^{\circ} \text{C}$ previo a su uso.

Preparación de buffer fosfato. Se agregó 3.4 g de fosfato de potasio monobásico (K_2PO_4 , 3246-01, J.T.Baker) en 50 mL de H_2O destilada. Se ajustó el pH 7.2 y el volumen a 100 mL en un balón volumétrico. Para el estudio, se utilizó 1.25 mL de solución madre de buffer fosfato en 1000 mL de agua destilada. La solución diluida fue distribuida en volúmenes de 90 y 450 mL. Finalmente, se esterilizo el medio a 121°C por 15 minutos en Autoclave horizontal, Sterimatic Maket Forge®.

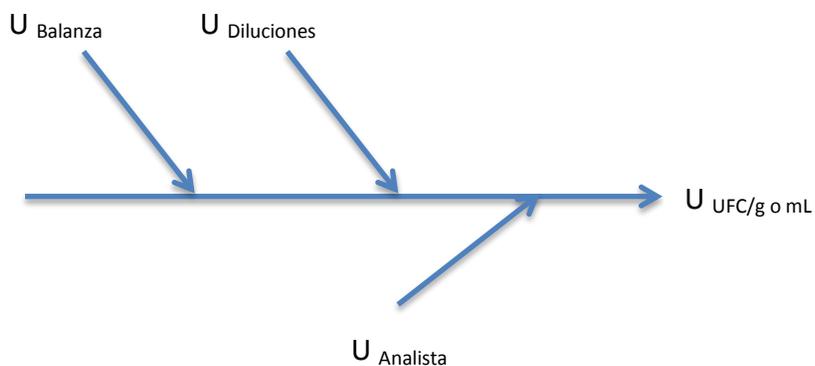
Anexo 2. Registro de preparación de medios de cultivo utilizados.

Medio	Lote	Marca	Hoja de bitácora	Fecha de caducidad del medio deshidratado
ACE	8380312	Biomark	BPS-001 FOLIO 86	feb-17
			BPS-001 FOLIO 88	
			BPS-001 FOLIO 89	
ACE Caldo Universal	105048B	Neogen	BPS-001 FOLIO 95	abr-16
	208412	BD	BPS-001 FOLIO 87	abr-14
ABRV	8420312	Biomark	BPS-001 FOLIO 90	feb-17
			BPS-001 FOLIO 96	

Anexo 3. Lista de equipos utilizados en la validación.

Equipo	Marca	Código LMAZ
Autoclave horizontal	Sterimatic Maket Forge	E-LMAZ-065
Balanza	Precisa	E-LMAZ-060
Balanza analítica	Precisa	E-LMAZ-007
Cámara de Flujo laminar	LABCONCO	E-LMAZ-028
Esterilizador de asas (Bacticinerator*IV)	McCormick Scientific	E-LMAZ-029
Incubadora	Fisher Scientific	E-LMAZ-047
Incubadora	Thermo Scientific	E-LMAZ-030
Plato de calentamiento con agitación	IKA	E-LMAZ-003
Plato de calentamiento con agitación	Fisher Scientific	E-LMAZ-002
Potenciómetro	Thermo Scientific	E-LAMZ-034
Homogeneizador peristáltico	IUL Instruments	E-LMAZ-051
Termobañó	Precision	E-LMAZ-038
Termobañó	Thermo Scientific	E-LMAZ-067

Anexo 4. Estimación de la incertidumbre para el método de bacterias mesófilas aerobias.



Rango de variabilidad (tolerancia) de los instrumentos de laboratorio declarado por el fabricante y que fueron utilizados en el estudio.

Pipeta 5 ml \pm 0.5 ml
Probeta 100 ml \pm 0.15 ml
Probeta 500 ml \pm 5 ml

Para estimar la incertidumbre de los instrumentos de medición de volumen, se utilizó una evaluación de tipo B, con una distribución triangular, usando la siguiente ecuación:

$$u = \frac{a}{\sqrt{3}}$$

Siendo:

u : Incertidumbre

a : Rango de variabilidad (tolerancia declarada por el fabricante)

Ejemplo:

$$u_{100\text{ml}} = \frac{0.5}{\sqrt{3}} = 0.2886 \text{ ml}$$
$$u_{5\text{ml}} = \frac{0.15}{\sqrt{3}} = 0.0866 \text{ ml}$$
$$u_{500\text{ml}} = \frac{5}{\sqrt{3}} = 2.8867 \text{ ml}$$

Una vez calculado este valor se debe dividir para la cantidad de volumen que se utilizó con cada equipo, obteniendo así el valor de incertidumbre estándar relativa (RSU) que se representa por la letra w .

Ejemplo:

$$w_{50 \text{ ml}} = \frac{0.2886}{50} = 0.0057$$
$$w_{90 \text{ ml}} = \frac{0.2886}{90} = 0.0032$$
$$w_{10 \text{ ml}} = \frac{0.0866}{10} = 0.0086$$
$$w_{450 \text{ ml}} = \frac{2.8867}{450} = 0.0064$$

Una vez obtenido el valor RSU se procede a calcular el valor de incertidumbre por dilución.

$$w_f^2 = \frac{u_b^2 + b^2 w_a^2}{(a + b)^2}$$

Siendo:

w_f^2 : RSU de dilución

u_b^2 : incertidumbre del volumen de diluyente

b : volumen de diluyente

w_a^2 : RSU de alícuota

a : volumen de alícuota

Cálculo incertidumbre total de diluciones:

$$w_F^2 = w_{f^{-1}}^2 + w_{f^{-2}}^2 + w_{f^{-3}}^2$$

Siendo:

w_F^2 = Incertidumbre total de diluciones

$w_{f^{-1}}^2$ = Incertidumbre dilución 10^{-1}

$w_{f^{-2}}^2$ = Incertidumbre dilución 10^{-2}

$w_{f^{-3}}^2$ = Incertidumbre dilución 10^{-3}

Una vez realizado el cálculo de incertidumbre total de diluciones se puede proceder al cálculo de la incertidumbre total de equipos y conteo.

Dilución 10^{-1} :

$$w_f^2 = \frac{2.8867^2 + (450^2)(0.0057)^2}{(50 + 450)^2} = 0.00006$$

Dilución 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} :

$$w_f^2 = \frac{0.2886^2 + (90^2)(0.0086)^2}{(10 + 90)^2} = 0.0007$$

Cálculo incertidumbre total de diluciones:

$$w_F^2 = w_{f^{-1}}^2 + 3w_{f^{-2}}^2$$

Siendo:

w_F^2 = Incertidumbre total de diluciones

$w_{f^{-1}}^2$ = Incertidumbre dilución 10^{-1}

$w_{f^{-2}}^2$ = Incertidumbre dilución 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}

$$w_F^2 = 0.00006 + 3(0.00007) = 0.00027$$

Una vez realizado el cálculo de incertidumbre total de diluciones se calcula la incertidumbre total del conteo utilizando una evaluación de tipo A con los datos de la validación del método.

Resultados de la validación de método para la determinación de bacterias mesófilas aerobias.

Código	Repetición	Matriz	UFC Inoculado	Log UFC/g Inoculado	Recuperado UFC/g	Log UFC/g	% Recuperación
463	3	Carne	55	1.7404	65	1.8129	104.2
457	2	Carne	67	1.8261	85	1.9294	105.7
699	2	Carne	560	2.7482	180	2.2553	82.1
996	2	Carne	560	2.7482	380	2.5798	93.9
982	3	Carne	580	2.7634	440	2.6435	95.7
91	3	Carne	5400	3.7324	4400	3.6435	97.6
579	2	Carne	8300	3.9191	3900	3.5911	91.6
333	2	Carne	8300	3.9191	2900	3.4624	88.3
427	3	Carne	68000	4.8325	40000	4.6021	95.2
527	2	Carne	85000	4.9294	36000	4.5563	92.4
944	2	Carne	85000	4.9294	18000	4.2553	86.3
372	3	Carne	610000	5.7853	250000	5.3979	93.3
187	2	Carne	670000	5.8261	220000	5.3424	91.7
654	3	Leche	55	1.7404	105	2.0212	116.1
25	1	Leche	90	1.9542	80	1.9031	97.4
182	3	Leche	580	2.7634	500	2.6990	97.7
172	1	Leche	700	2.8451	500	2.6990	94.9
963	1	Leche	700	2.8451	540	2.7324	96.0
949	3	Leche	5400	3.7324	5600	3.7482	100.4
68	1	Leche	7300	3.8633	4400	3.6435	94.3
796	1	Leche	7300	3.8633	4800	3.6812	95.3
549	3	Leche	68000	4.8325	64000	4.8062	99.5
679	3	Leche	68000	4.8325	58000	4.7634	98.6
13	1	Leche	87000	4.9395	52000	4.7160	95.5
70	3	Leche	610000	5.7853	560000	5.7482	99.4
85	2	Leche	670000	5.8261	540000	5.7324	98.4
446	3	Maíz	55	1.7404	80	1.9031	109.4
642	1	Maíz	90	1.9542	65	1.8129	92.8
662	3	Maíz	580	2.7634	710	2.8513	103.2
422	1	Maíz	700	2.8451	630	2.7993	98.4
379	1	Maíz	700	2.8451	780	2.8921	101.7
478	3	Maíz	5400	3.7324	5400	3.7324	100.0
783	1	Maíz	7300	3.8633	7300	3.8633	100.0
431	1	Maíz	7300	3.8633	5400	3.7324	96.6

Código	Repetición	Matriz	UFC Inoculado	Log UFC/g Inoculado	Recuperado UFC/g	Log UFC/g	% Recuperación
645	3	Maíz	68000	4.8325	38000	4.5798	94.8
756	2	Maíz	85000	4.9294	54000	4.7324	96.0
226	1	Maíz	87000	4.9395	37000	4.5682	92.5
508	3	Maíz	610000	5.7853	510000	5.7076	98.7
473	2	Maíz	670000	5.8261	460000	5.6628	97.2
463	3	Carne	55	1.7404	65	1.8129	104.2
457	2	Carne	67	1.8261	70	1.8451	101.0
699	2	Carne	560	2.7482	190	2.2788	82.9
996	2	Carne	560	2.7482	380	2.5798	93.9
982	3	Carne	580	2.7634	420	2.6232	94.9
91	3	Carne	5400	3.7324	4800	3.6812	98.6
579	2	Carne	8300	3.9191	3800	3.5798	91.3
333	2	Carne	8300	3.9191	3000	3.4771	88.7
427	3	Carne	68000	4.8325	40000	4.6021	95.2
527	2	Carne	85000	4.9294	37000	4.5682	92.7
944	2	Carne	85000	4.9294	26000	4.4150	89.6
372	3	Carne	610000	5.7853	210000	5.3222	92.0
187	2	Carne	670000	5.8261	220000	5.3424	91.7
654	3	Leche	55	1.7404	100	2.0000	114.9
25	1	Leche	90	1.9542	80	1.9031	97.4
182	3	Leche	580	2.7634	480	2.6812	97.0
172	1	Leche	700	2.8451	560	2.7482	96.6
963	1	Leche	700	2.8451	580	2.7634	97.1
949	3	Leche	5400	3.7324	6000	3.7782	101.2
68	1	Leche	7300	3.8633	5800	3.7634	97.4
796	1	Leche	7300	3.8633	6800	3.8325	99.2
549	3	Leche	68000	4.8325	62000	4.7924	99.2
679	3	Leche	68000	4.8325	60000	4.7782	98.9
13	1	Leche	87000	4.9395	58000	4.7634	96.4
70	3	Leche	610000	5.7853	580000	5.7634	99.6
85	2	Leche	670000	5.8261	530000	5.7243	98.3
446	3	Maíz	55	1.7404	65	1.8129	104.2
642	1	Maíz	90	1.9542	110	2.0414	104.5
662	3	Maíz	580	2.7634	680	2.8325	102.5
422	1	Maíz	700	2.8451	760	2.8808	101.3
379	1	Maíz	700	2.8451	820	2.9138	102.4
478	3	Maíz	5400	3.7324	5300	3.7243	99.8
783	1	Maíz	7300	3.8633	8800	3.9445	102.1
431	1	Maíz	7300	3.8633	5700	3.7559	97.2
645	3	Maíz	68000	4.8325	40000	4.6021	95.2
756	2	Maíz	85000	4.9294	56000	4.7482	96.3

Código	Repetición	Matriz	UFC Inoculado	Log UFC/g Inoculado	Recuperado UFC/g	Log UFC/g	% Recuperación
226	1	Maíz	87000	4.9395	50000	4.6990	95.1
508	3	Maíz	610000	5.7853	540000	5.7324	99.1
473	2	Maíz	670000	5.8261	470000	5.6721	97.4
463	3	Carne	55	1.7404	50	1.6990	97.6
457	2	Carne	67	1.8261	55	1.7404	95.3
699	2	Carne	560	2.7482	190	2.2788	82.9
996	2	Carne	560	2.7482	380	2.5798	93.9
982	3	Carne	580	2.7634	400	2.6021	94.2
91	3	Carne	5400	3.7324	4400	3.6435	97.6
579	2	Carne	8300	3.9191	3400	3.5315	90.1
333	2	Carne	8300	3.9191	2400	3.3802	86.3
427	3	Carne	68000	4.8325	40000	4.6021	95.2
527	2	Carne	85000	4.9294	33000	4.5185	91.7
944	2	Carne	85000	4.9294	12000	4.0792	82.8
372	3	Carne	610000	5.7853	200000	5.3010	91.6
187	2	Carne	670000	5.8261	160000	5.2041	89.3
654	3	Leche	55	1.7404	85	1.9294	110.9
25	1	Leche	90	1.9542	70	1.8451	94.4
182	3	Leche	580	2.7634	450	2.6532	96.0
172	1	Leche	700	2.8451	580	2.7634	97.1
963	1	Leche	700	2.8451	580	2.7634	97.1
949	3	Leche	5400	3.7324	5600	3.7482	100.4
68	1	Leche	7300	3.8633	5800	3.7634	97.4
796	1	Leche	7300	3.8633	5600	3.7482	97.0
549	3	Leche	68000	4.8325	58000	4.7634	98.6
679	3	Leche	68000	4.8325	52000	4.7160	97.6
13	1	Leche	87000	4.9395	55000	4.7404	96.0
70	3	Leche	610000	5.7853	540000	5.7324	99.1
85	2	Leche	670000	5.8261	480000	5.6812	97.5
446	3	Maíz	55	1.7404	55	1.7404	100.0
642	1	Maíz	90	1.9542	95	1.9777	101.2
662	3	Maíz	580	2.7634	660	2.8195	102.0
422	1	Maíz	700	2.8451	690	2.8388	99.8
379	1	Maíz	700	2.8451	800	2.9031	102.0
478	3	Maíz	5400	3.7324	5200	3.7160	99.6
783	1	Maíz	7300	3.8633	8400	3.9243	101.6
431	1	Maíz	7300	3.8633	6200	3.7924	98.2
645	3	Maíz	68000	4.8325	34000	4.5315	93.8
756	2	Maíz	85000	4.9294	38000	4.5798	92.9
226	1	Maíz	87000	4.9395	43000	4.6335	93.8
508	3	Maíz	610000	5.7853	500000	5.6990	98.5

Código	Repetición	Matriz	UFC Inoculado	Log UFC/g Inoculado	Recuperado UFC/g	Log UFC/g	% Recuperación
473	2	Maíz	670000	5.8261	410000	5.6128	96.3
Promedio							96.89593
Desviación estándar							5.50859
Varianza							30.34461

La incertidumbre estándar relativa del conteo para el caso de bacterias mesófilas aerobias es de 0.05685.

A continuación se presenta la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ = Incertidumbre total

w_F^2 = Incertidumbre total de diluciones

w_C^2 = Incertidumbre conteo

$$\sum w^2 = 0.00027 + 0.05508 = 0.05535$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00027 * 100}{0.05535} = 0.49\%$$

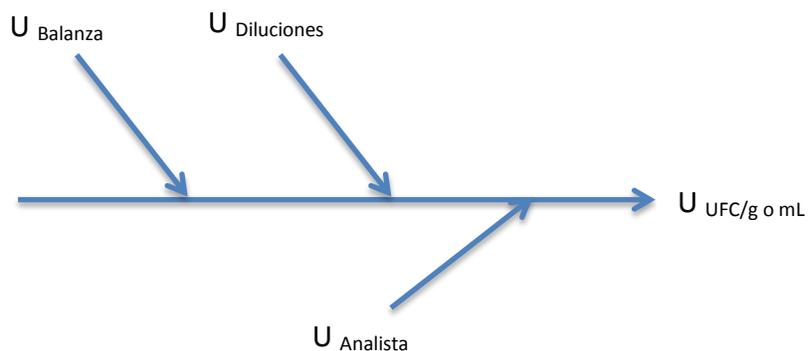
Incertidumbre de conteo:

$$w_C^2 = \frac{0.05508 * 100}{0.05535} = 99.51\%$$

Se observa que el mayor porcentaje de incertidumbre se encuentra en el conteo del analista. Por esta razón, se presenta el cálculo de incertidumbre únicamente por conteo de placas, ya que es la mayor variación en el estudio.

Para objeto del reporte de la incertidumbre expandida, se aplica el factor de cobertura $k=2$ (nivel de confianza del 95%) resultando de 0.1137 (11.37%) (Corry *et al.* 2007).

Anexo 5. Estimación de la incertidumbre para el método de coliformes totales.



Rango de variabilidad (tolerancia) de los instrumentos de laboratorio declarado por el fabricante y que fueron utilizados en el estudio.

Pipeta 5 ml \pm 0.5 ml
 Probeta 100 ml \pm 0.15 ml
 Probeta 500 ml \pm 5 ml

Para estimar la incertidumbre de los instrumentos de medición de volumen, se utilizó una evaluación de tipo B, con una distribución triangular, usando la siguiente ecuación:

$$u = \frac{a}{\sqrt{3}}$$

Siendo:

u : Incertidumbre

a : Rango de variabilidad (tolerancia declarada por el fabricante)

Ejemplo:

$$u_{100\text{ml}} = \frac{0.5}{\sqrt{3}} = 0.2886 \text{ ml}$$

$$u_{5\text{ml}} = \frac{0.15}{\sqrt{3}} = 0.0866 \text{ ml}$$

$$u_{500\text{ml}} = \frac{5}{\sqrt{3}} = 2.8867 \text{ ml}$$

Una vez calculado este valor se debe dividir para la cantidad de volumen que se utilizó con cada equipo, obteniendo así el valor de incertidumbre estándar relativa (RSU) que se representa por la letra w .

Ejemplo:

$$\begin{aligned}w_{50 \text{ ml}} &= \frac{0.2886}{50} = 0.0057 \\w_{90 \text{ ml}} &= \frac{0.2886}{90} = 0.0032 \\w_{10 \text{ ml}} &= \frac{0.0866}{10} = 0.0086 \\w_{450 \text{ ml}} &= \frac{2.8867}{450} = 0.0064\end{aligned}$$

Una vez obtenido el valor RSU se procede a calcular el valor de incertidumbre por dilución.

$$w_f^2 = \frac{u_b^2 + b^2 w_a^2}{(a + b)^2}$$

Siendo:

w_f^2 : RSU de dilución

u_b^2 : incertidumbre del volumen de diluyente

b : volumen de diluyente

w_a^2 : RSU de alícuota

a : volumen de alícuota

Cálculo incertidumbre total de diluciones:

$$w_F^2 = w_{f^{-1}}^2 + w_{f^{-2}}^2 + w_{f^{-3}}^2$$

Siendo:

w_F^2 = Incertidumbre total de diluciones

$w_{f^{-1}}^2$ = Incertidumbre dilución 10^{-1}

$w_{f^{-2}}^2$ = Incertidumbre dilución 10^{-2}

$w_{f^{-3}}^2$ = Incertidumbre dilución 10^{-3}

Una vez realizado el cálculo de incertidumbre total de diluciones se puede proceder al cálculo de la incertidumbre total de equipos y conteo.

Dilución 10^{-1} :

$$w_f^2 = \frac{2.8867^2 + (450^2)(0.0057)^2}{(50 + 450)^2} = 0.00006$$

Dilución 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} :

$$w_f^2 = \frac{0.2886^2 + (90^2)(0.0086)^2}{(10 + 90)^2} = 0.0007$$

Cálculo incertidumbre total de diluciones:

$$w_F^2 = w_{f-1}^2 + 3w_{f-2}^2$$

Siendo:

w_F^2 = Incertidumbre total de diluciones

w_{f-1}^2 = Incertidumbre dilución 10^{-1}

w_{f-2}^2 = Incertidumbre dilución 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}

$$w_F^2 = 0.00006 + 3(0.00007) = 0.00027$$

Una vez realizado el cálculo de incertidumbre total de diluciones se calcula la incertidumbre total del conteo utilizando una evaluación de tipo A con los datos de la validación del método.

Resultados de la validación de método para la determinación de coliformes totales.

Código	Repetición	Matriz	UFC Inoculado	Log UFC/g Inoculado	Recuperado UFC/g	Log UFC/g	% Recuperación
463	3	Carne	55	1.7404	35	1.5441	88.7
457	2	Carne	67	1.8261	65	1.8129	99.3
699	2	Carne	560	2.7482	260	2.4150	87.9
996	2	Carne	560	2.7482	300	2.4771	90.1
982	3	Carne	580	2.7634	500	2.6990	97.7
91	3	Carne	5400	3.7324	3600	3.5563	95.3
333	2	Carne	8300	3.9191	2400	3.3802	86.3
579	2	Carne	8300	3.9191	3800	3.5798	91.3
427	3	Carne	68000	4.8325	58000	4.7634	98.6
372	3	Carne	85000	4.9294	180000	5.2553	106.6
527	2	Carne	85000	4.9294	30000	4.4771	90.8
944	2	Carne	610000	5.7853	18000	4.2553	73.6
187	2	Carne	670000	5.8261	190000	5.2788	90.6
654	3	Leche	55	1.7404	55	1.7404	100.0
25	1	Leche	90	1.9542	75	1.8751	95.9
182	3	Leche	580	2.7634	600	2.7782	100.5
172	1	Leche	700	2.8451	320	2.5051	88.1

Código	Repetición	Matriz	UFC Inoculado	Log UFC/g Inoculado	Recuperado UFC/g	Log UFC/g	% Recuperación
963	1	Leche	700	2.8451	520	2.7160	95.5
949	3	Leche	5400	3.7324	5000	3.6990	99.1
68	1	Leche	7300	3.8633	4200	3.6232	93.8
796	1	Leche	7300	3.8633	5400	3.7324	96.6
549	3	Leche	68000	4.8325	59000	4.7709	98.7
679	3	Leche	68000	4.8325	46000	4.6628	96.5
13	1	Leche	87000	4.9395	34000	4.5315	91.7
70	3	Leche	610000	5.7853	560000	5.7482	99.4
85	2	Leche	670000	5.8261	540000	5.7324	98.4
446	3	Maíz	55	1.7404	50	1.6990	97.6
642	1	Maíz	90	1.9542	120	2.0792	106.4
662	3	Maíz	580	2.7634	700	2.8451	103.0
379	1	Maíz	700	2.8451	680	2.8325	99.6
422	1	Maíz	700	2.8451	700	2.8451	100.0
478	3	Maíz	5400	3.7324	5600	3.7482	100.4
431	1	Maíz	7300	3.8633	5500	3.7404	96.8
783	1	Maíz	7300	3.8633	6900	3.8388	99.4
645	3	Maíz	68000	4.8325	45000	4.6532	96.3
756	2	Maíz	85000	4.9294	50000	4.6990	95.3
226	1	Maíz	87000	4.9395	61000	4.7853	96.9
508	3	Maíz	610000	5.7853	730000	5.8633	101.3
473	2	Maíz	670000	5.8261	570000	5.7559	98.8
463	3	Carne	55	1.7404	35	1.5441	88.7
457	2	Carne	67	1.8261	65	1.8129	99.3
699	2	Carne	560	2.7482	570	2.7559	100.3
996	2	Carne	560	2.7482	300	2.4771	90.1
982	3	Carne	580	2.7634	510	2.7076	98.0
91	3	Carne	5400	3.7324	3600	3.5563	95.3
333	2	Carne	8300	3.9191	2600	3.4150	87.1
579	2	Carne	8300	3.9191	3600	3.5563	90.7
427	3	Carne	68000	4.8325	58000	4.7634	98.6
372	3	Carne	85000	4.9294	200000	5.3010	107.5
527	2	Carne	85000	4.9294	30000	4.4771	90.8
944	2	Carne	610000	5.7853	17000	4.2304	73.1
187	2	Carne	670000	5.8261	190000	5.2788	90.6
654	3	Leche	55	1.7404	55	1.7404	100.0
25	1	Leche	90	1.9542	75	1.8751	95.9
182	3	Leche	580	2.7634	520	2.7160	98.3
172	1	Leche	700	2.8451	510	2.7076	95.2

Código	Repetición	Matriz	UFC Inoculado	Log UFC/g Inoculado	Recuperado UFC/g	Log UFC/g	% Recuperación
963	1	Leche	700	2.8451	560	2.7482	96.6
949	3	Leche	5400	3.7324	4900	3.6902	98.9
68	1	Leche	7300	3.8633	7000	3.8451	99.5
796	1	Leche	7300	3.8633	6200	3.7924	98.2
549	3	Leche	68000	4.8325	58000	4.7634	98.6
679	3	Leche	68000	4.8325	52000	4.7160	97.6
13	1	Leche	87000	4.9395	72000	4.8573	98.3
70	3	Leche	610000	5.7853	580000	5.7634	99.6
85	2	Leche	670000	5.8261	530000	5.7243	98.3
446	3	Maíz	55	1.7404	60	1.7782	102.2
642	1	Maíz	90	1.9542	120	2.0792	106.4
662	3	Maíz	580	2.7634	680	2.8325	102.5
379	1	Maíz	700	2.8451	710	2.8513	100.2
422	1	Maíz	700	2.8451	720	2.8573	100.4
478	3	Maíz	5400	3.7324	5600	3.7482	100.4
431	1	Maíz	7300	3.8633	6000	3.7782	97.8
783	1	Maíz	7300	3.8633	7400	3.8692	100.2
645	3	Maíz	68000	4.8325	45000	4.6532	96.3
756	2	Maíz	85000	4.9294	48000	4.6812	95.0
226	1	Maíz	87000	4.9395	59000	4.7709	96.6
508	3	Maíz	610000	5.7853	580000	5.7634	99.6
473	2	Maíz	670000	5.8261	560000	5.7482	98.7
463	3	Carne	55	1.7404	35	1.5441	88.7
457	2	Carne	67	1.8261	65	1.8129	99.3
699	2	Carne	560	2.7482	140	2.1461	78.1
996	2	Carne	560	2.7482	310	2.4914	90.7
982	3	Carne	580	2.7634	420	2.6232	94.9
91	3	Carne	5400	3.7324	3400	3.5315	94.6
333	2	Carne	8300	3.9191	2400	3.3802	86.3
579	2	Carne	8300	3.9191	3800	3.5798	91.3
427	3	Carne	68000	4.8325	54000	4.7324	97.9
372	3	Carne	85000	4.9294	200000	5.3010	107.5
527	2	Carne	85000	4.9294	23000	4.3617	88.5
944	2	Carne	610000	5.7853	16000	4.2041	72.7
187	2	Carne	670000	5.8261	230000	5.3617	92.0
654	3	Leche	55	1.7404	55	1.7404	100.0
25	1	Leche	90	1.9542	70	1.8451	94.4
182	3	Leche	580	2.7634	595	2.7745	100.4
172	1	Leche	700	2.8451	400	2.6021	91.5

Código	Repetición	Matriz	UFC Inoculado	Log UFC/g Inoculado	Recuperado UFC/g	Log UFC/g	% Recuperación
963	1	Leche	700	2.8451	550	2.7404	96.3
949	3	Leche	5400	3.7324	4200	3.6232	97.1
68	1	Leche	7300	3.8633	5400	3.7324	96.6
796	1	Leche	7300	3.8633	5800	3.7634	97.4
549	3	Leche	68000	4.8325	58000	4.7634	98.6
679	3	Leche	68000	4.8325	52000	4.7160	97.6
13	1	Leche	87000	4.9395	43000	4.6335	93.8
70	3	Leche	610000	5.7853	540000	5.7324	99.1
85	2	Leche	670000	5.8261	520000	5.7160	98.1
446	3	Maíz	55	1.7404	55	1.7404	100.0
642	1	Maíz	90	1.9542	110	2.0414	104.5
662	3	Maíz	580	2.7634	670	2.8261	102.3
379	1	Maíz	700	2.8451	710	2.8513	100.2
422	1	Maíz	700	2.8451	720	2.8573	100.4
478	3	Maíz	5400	3.7324	5600	3.7482	100.4
431	1	Maíz	7300	3.8633	5600	3.7482	97.0
783	1	Maíz	7300	3.8633	7000	3.8451	99.5
645	3	Maíz	68000	4.8325	44000	4.6435	96.1
756	2	Maíz	85000	4.9294	41000	4.6128	93.6
226	1	Maíz	87000	4.9395	58000	4.7634	96.4
508	3	Maíz	610000	5.7853	580000	5.7634	99.6
473	2	Maíz	670000	5.8261	520000	5.7160	98.1
Promedio							96.20171
SD							6.07728
Varianza							36.93338

La incertidumbre estándar relativa del conteo para el caso de coliformes totales es de 0.06317.

A continuación se presenta la incertidumbre total:

$$\sum w^2 = w_F^2 + w_C^2$$

$\sum w^2$ = Incertidumbre total

w_F^2 = Incertidumbre total de diluciones

w_C^2 = Incertidumbre conteo

$$\sum w^2 = 0.00027 + 0.06077 = 0.06104$$

Porcentaje que aporta cada incertidumbre

Incertidumbre de diluciones:

$$w_F^2 = \frac{0.00027 * 100}{0.06104} = 0.44\%$$

Incertidumbre de conteo:

$$w_C^2 = \frac{0.06077 * 100}{0.06104} = 99.56\%$$

Se observa que el mayor porcentaje de incertidumbre se encuentra en el conteo del analista. Por esta razón, se presenta el cálculo de incertidumbre únicamente por conteo de placas, ya que es la mayor variación en el estudio.

Para objeto del reporte de la incertidumbre expandida, se aplica el factor de cobertura $k=2$ (nivel de confianza del 95%) resultando 0.1215 (12.15%). (Corry *et al.* 2007).