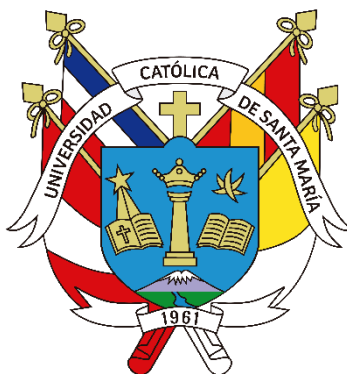


**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y**  
**Biotechnológicas**  
**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**



**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA COLIFORMES TOTALES Y *Escherichia coli***  
**UTILIZANDO EL MEDIO DE CULTIVO COMERCIAL CROMOGÉNICO CCA**  
**(AGAR PARA COLIFORMES CHROMOCULT), EN QUESOS NO MADURADOS, 2023**

Tesis presentada por las Bachilleres:

**Mayta Flores, Milagros Edith**

**Quispe Gomez, Brauli Yeymi**

para optar el Título Profesional de:

**Químico Farmacéutico**

Asesor (a):

**Mg. Marcilla Truyenque, Shaneri**

**Arequipa - Perú**

**2023**

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**

**FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**TITULACIÓN CON TESIS**

**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR**

Arequipa, 21 de Noviembre del 2023

**Dictamen: 008169-C-EPFyB-2023**

Visto el borrador del expediente 008169, presentado por:

**2017223972 - QUISPE GOMEZ BRAULI YEYMI**

**2017246282 - MAYTA FLORES MILAGROS EDITH**

Titulado:

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA COLIFORMES TOTALES Y ESCHERICHIA COLI UTILIZANDO  
EL MEDIO DE CULTIVO COMERCIAL CROMOGENICO CCA (AGAR PARA COLIFORMES  
CHROMOCULT), EN QUESOS NO MADURADOS, 2023**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

**00476696 - BERNABE ORTIZ JULIO CESAR  
DICTAMINADOR**



**29630612 - TERAN DIANDERAS ADILMI MILAGRO  
DICTAMINADOR**



**06431917 - GUERRERO BENAVIDES MARIELLA ISABEL  
DICTAMINADOR**



# VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA COLIFORMES TOTALES Y Escherichia coli UTILIZANDO EL MEDIO DE CULTIVO COMERCIAL CROMOGÉNICO CCA (AGAR PARA COLIFORMES CHROMOCULT), EN QUESOS NO MADURADOS, 2023

## INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

INDICE DE SIMILITUD

2%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1

[www.javeriana.edu.co](http://www.javeriana.edu.co)

Fuente de Internet

1%

2

[www.condalab.com](http://www.condalab.com)

Fuente de Internet

1%

3

[1library.co](http://1library.co)

Fuente de Internet

1%

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado

## DEDICATORIA

*A Dios, por encaminar cada paso en mi vida, por ser la luz que me guía y por darme la oportunidad de vivir en compañía de las personas que más amo.*

*A mis padres, por enseñarme muchos valores de los cuales han forjado mi personalidad para poder concluir una etapa muy importante en mi vida.*

*A mis hermanos, por demostrarme que jamás estaré sola porque su compañía está siempre presente y la forma en cómo me alientan es la mejor.*

*A mi compañera de tesis, por la calidad de persona que es y por su apoyo incondicional desde que nos conocimos, concluir con ella esta etapa académica es lo mejor que me ha podido pasar en la vida.*

*A mis amistades, por ser un soporte en mi vida y por compartir muchos momentos juntos.*

*A mis amigos del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad, por brindarme el apoyo y las herramientas necesarias para hacer posible este momento muy importante.*

*A mis maestros, por guiarme en este periodo académico para poder construir mi futuro profesional.*

## AGRADECIMIENTO

*Mg. Shaneri Marcilla Truyenque, asesora de tesis, quien estuvo presente en este proceso largo de investigación y cada consejo suyo fue de mucha ayuda para poder concretar nuestra tesis.*

*Dr. Ricardo Abril Ramírez, quien fue nuestro tutor en nuestro internado, con cada enseñanza y conocimiento suyo pudo ser posible esta investigación.*

*Ing. Rodrigo Ramos Salas, quien supo guiarnos en todo este camino con su conocimiento sobre el tema de tesis, nos brindó muchos consejos y también nos aportó mucha sabiduría para ejecutar la presente tesis.*

*Mg. Tiffany Vincent Lozano, quien nos ayudó en momentos difíciles en los cuales no encontrábamos solución, pero gracias a su compañía y entusiasmo que nos motivó mucho en este camino pudimos encontrar una salida a nuestros problemas.*

*Ing. Marcia Quequezana Bedregal, quien se convirtió en una persona fundamental en este proceso ya que siempre estaba dispuesta para ayudarnos, estamos muy agradecidas por su generosidad con nosotras.*

*Jessica y Xiomara, quienes nos brindaron una amistad incondicional e irremplazable en este proceso, estamos agradecidas por coincidir en esta vida con ustedes.*

*Internas de laboratorio, quienes fueron nuestra compañía en esta investigación, gracias a su alegría y por permitirnos compartir muchos momentos juntas.*

*Miembros del jurado evaluador, quienes nos brindaron su tiempo, dedicación y apoyo en nuestra investigación.*

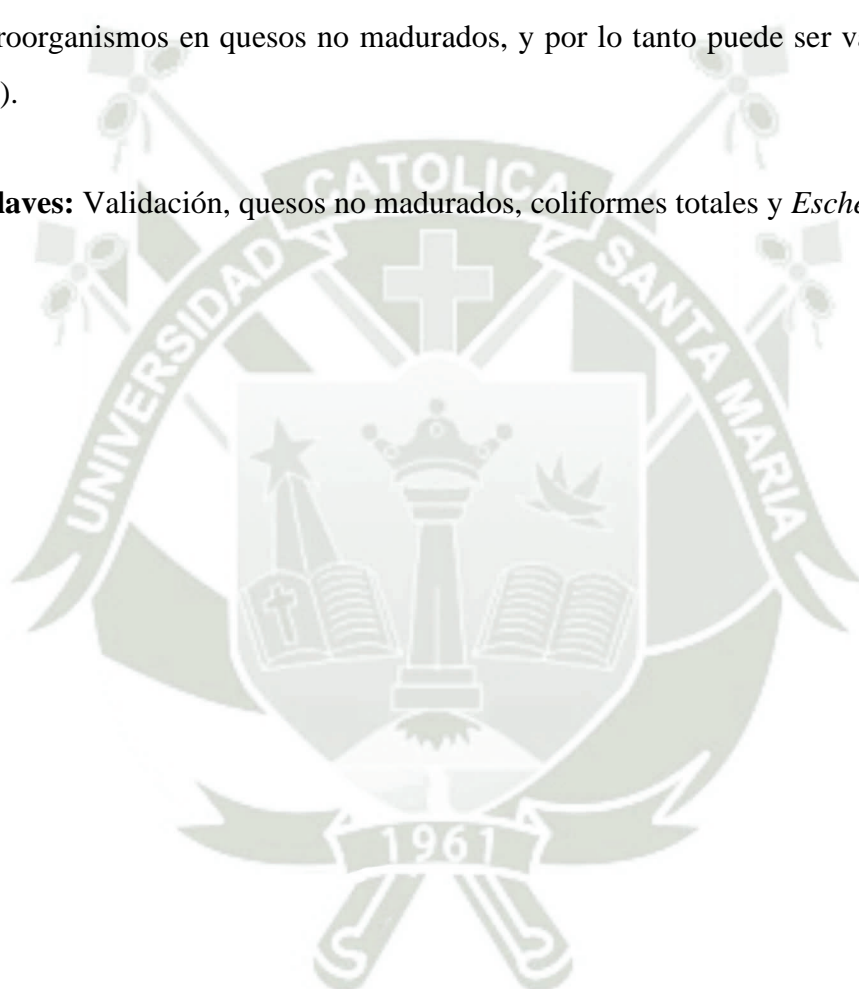
## RESUMEN

En el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad (LECC) de la Universidad Católica de Santa María de la ciudad de Arequipa, una de las muestras de mayor concurrencia son los quesos no madurados. El queso representa uno de los productos lácteos de mayor consumo en el Perú, por lo que su análisis es de suma relevancia. El LECC realiza análisis microbiológicos en una amplia variedad de alimentos de consumo humano, que deben cumplir con una calidad microbiológica, en el que se evalúa la inocuidad alimentaria y la calidad comercial del producto. Los quesos no madurados que tienen bastante afluencia en el laboratorio deben someterse a este análisis de calidad, y dentro de este, se encuentra el análisis de recuento de coliformes totales y *E. coli* siendo el CCA (Agar para Coliformes Chromocult) uno de los medios más utilizados, sin embargo, este no se encuentra validado para esta muestra de alimento según la ISO (Organización Internacional de Normalización) y por ende tampoco se encuentra validado en el LECC de la UCSM. Es por ello que, en el presente trabajo, se evaluó a este medio de cultivo en base a la ISO 16140-4 “Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia”.

Las muestras de quesos no madurados (fresco, lluta, mantecoso, mozzarella, ricotta y serranito) fueron obtenidos del mercado San Camilo de tres tiendas comerciales, obteniendo en total 18 quesos. El estudio fue observacional. La recolección de las muestras de quesos no madurados se realizó en el mes de Julio del 2023. Los datos recolectados se almacenaron en Microsoft Excel para realizar la estadística correspondiente. La recuperación relativa de coliformes totales y *E. coli* en CCA en comparación con TSA (Agar Tripton Soja) fue aceptable (101 % y 96 %), la desviación estándar interna de repetibilidad (0,00266 y 0,00287) y reproducibilidad (0,14870 y 0,17401) fueron suficientes. El rango de trabajo se estableció entre 10 - 150 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por placa según la ISO 4832. En el parámetro de precisión se obtuvo como desviación estándar de repetibilidad, para el método de coliformes totales de referencia fue 0,084 y para el alternativo 0,058, en el caso de la determinación de *E. coli* se obtuvo una desviación estándar de repetibilidad para el método de referencia de 0,076 y para el alternativo de 0,095, estos resultados se encuentran dentro del rango de los límites de aceptabilidad (AL) y además se calcularon los intervalos de tolerancia esperados ( $\beta$ -ETI) que cumplen con la condicional Upper  $\beta$ -ETI  $\leq$  AL y Lower  $\beta$ -ETI  $\geq$  -AL, por lo tanto el método alternativo es aceptado como equivalente al método de referencia. La veracidad relativa se confirmó por un gráfico de dispersión que mostró la distribución alrededor de la línea diagonal, indicando que si

existe concordancia entre los resultados de ambos métodos. Así mismo, se realizó el método de Bland-Altman que consiste en comparar dos métodos diferentes y analizar su concordancia en base a una misma variable, en el caso de coliformes totales y *E. coli* se obtuvo un límite superior (0.20715 y 0.24126) y un límite inferior (-0.02903 y -0.08165), donde la mayoría de los datos obtenidos se encuentran dentro de los límites y cumple con lo establecido por el parámetro. En conclusión, el método para el recuento de coliformes totales y *E. coli* utilizando el medio de cultivo comercial cromogénico CCA, demostró ser útil para la cuantificación simultánea de ambos microorganismos en quesos no madurados, y por lo tanto puede ser validado para este método (52).

**Palabras claves:** Validación, quesos no madurados, coliformes totales y *Escherichia coli*.



## ABSTRACT

At the Testing and Quality Control Laboratory (LECC) of the Universidad Católica de Santa María in the city of Arequipa, one of the most common samples are raw cheeses. Cheese is one of the most consumed dairy products in Peru, so its analysis is important. The LECC performs microbiological analyses on a wide variety of foods for human consumption, which must comply with microbiological quality, in which the food safety and commercial quality of the product is evaluated. Raw cheeses, which are quite common in the laboratory, must undergo this quality analysis, which includes the analysis of total coliform and *E. coli* counts, with CCA (Chromocult Coliform Agar) being one of the most commonly used methods. However, this method is not validated for this food sample according to ISO (International Organization for Standardization) and therefore is not validated at the LECC of UCSM. For this reason, in the present work, this culture medium was evaluated based on ISO 16140-4 "Protocol for the validation of alternative (registered) methods against reference methods".

Samples of raw cheeses were obtained from the San Camilo market from three commercial stores, obtaining a total of 18 cheeses. The study was observational. The raw cheese samples were collected in July 2023. The collected data were stored in Microsoft Excel to perform the corresponding statistics. The relative recovery of total coliforms and *E. coli* in CCA compared to TSA (Tryptone Soy Agar) was acceptable (101 % and 96 %), the internal standard deviation of repeatability (0.00266 and 0.00287) and reproducibility (0.14870 and 0.17401) were sufficient. The working range was established between 10 - 150 CFU (Colony Forming Units) per plate based on ISO 4832. In the accuracy profile, the repeatability standard deviation was 0.084 for the reference total coliforms method and 0.058 for the alternative method, in the determination of repeatability standard deviation for *E. coli* was obtained for the reference method of 0.076 and for the alternative of 0.095, these results are within the range of the limits of acceptability (AL) and in addition the expected tolerance intervals ( $\beta$ -ETI) were calculated that comply with the conditional Upper  $\beta$ -ETI  $\leq$  AL and Lower  $\beta$ -ETI  $\geq$  -AL, therefore the alternative method is accepted as equivalent to the reference method. The relative trueness was confirmed by a scatter plot that showed the distribution around the diagonal line, indicating that there is concordance between the results of both methods. In the case of total coliforms and *E. coli*, an upper limit (0.20715 and 0.24126) and a lower limit (-0.02903 and -0.08165) were obtained, where most of the data obtained are within the limits and comply with the established parameter. In conclusion, the method for the enumeration of total coliforms and *E. coli* using

the commercial chromogenic culture medium CCA proved to be useful for the simultaneous quantification of both microorganisms in raw cheeses, and therefore can be validated for this method (52).

**Key words:** Validation, raw cheeses, total coliforms y *Escherichia coli*.



## ÍNDICE

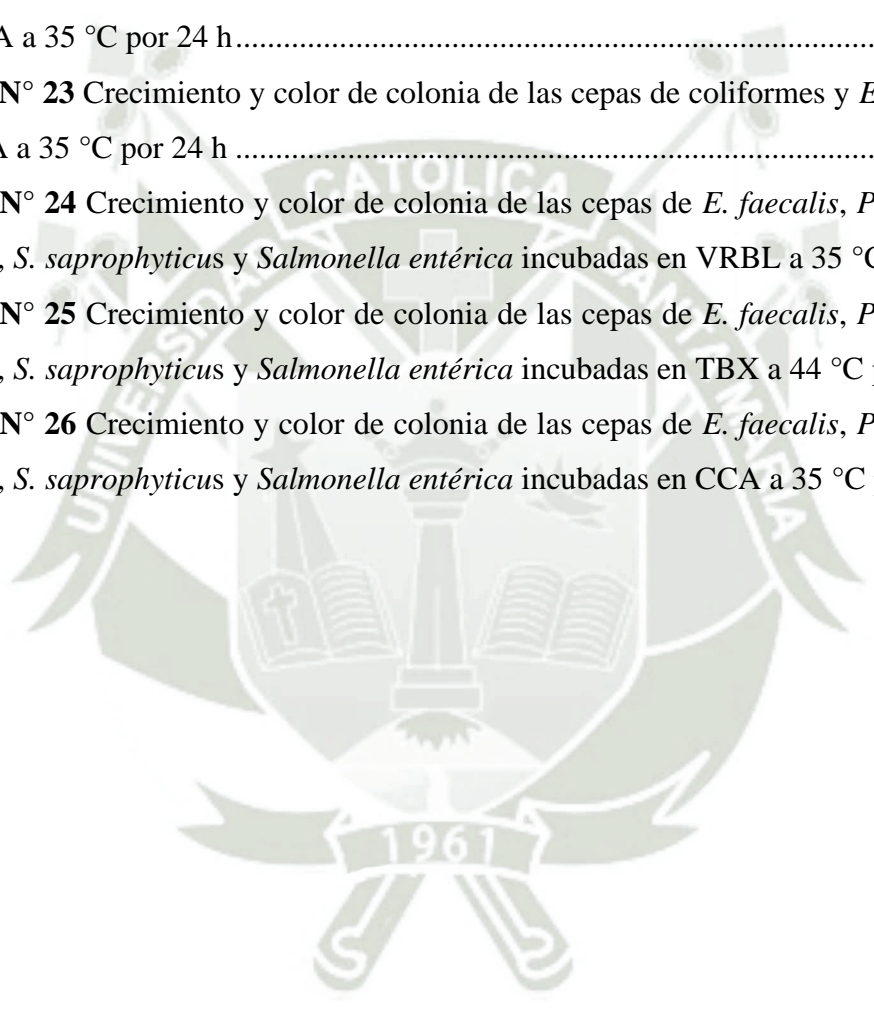
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTO.....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vii</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
<b>1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Determinación del problema .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Enunciado del problema.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Descripción del problema.....</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Justificación .....</b>	<b>6</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Objetivo general .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>7</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1. Queso.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2. Queso fresco.....</b>	<b>10</b>
<b>3.3. Microorganismos contaminantes.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Análisis microbiológico para coliformes totales y <i>E. coli</i> en alimentos según la ISO 4832 y 16649.....</b>	<b>25</b>
<b>3.5. Análisis microbiológico para coliformes totales y <i>E. coli</i> en aguas según la ISO 9308.....</b>	<b>26</b>
<b>3.6. Normativa nacional sanitaria .....</b>	<b>26</b>
<b>3.7. Validación .....</b>	<b>26</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>1. CAMPO DE VERIFICACION.....</b>	<b>32</b>
<b>1.1. Ubicación espacial.....</b>	<b>32</b>
<b>1.2. Ubicación temporal.....</b>	<b>32</b>
<b>1.3. Unidades de estudio .....</b>	<b>32</b>

1.4.	Identificación de los grupos .....	32
1.5.	Control de los grupos .....	32
2.	MATERIALES.....	32
2.1.	Instrumentos.....	32
2.2.	Medios y reactivos.....	33
2.3.	Materiales biológicos .....	34
2.4.	Materiales.....	34
2.5.	Muestra.....	35
2.6.	Otros materiales .....	35
3.	METODOLOGÍA .....	35
3.1.	Obtención y tratamiento de la muestra.....	35
3.2.	Recuento de colonias en placa de coliformes totales y <i>E. coli</i> en los métodos de referencia (VRBL y TBX) y alternativo (CCA) .....	36
3.3.	Análisis de los parámetros de validación según la ISO 16140-4.....	38
3.4.	Protocolo de análisis de coliformes totales y <i>E. coli</i> para quesos no madurados .....	41
CAPÍTULO III: RESULTADOS .....		42
DISCUSIONES .....		63
CONCLUSIONES .....		68
RECOMENDACIONES .....		70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		71
ANEXOS .....		78

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1</b> Cuadro de variables.....	5
<b>Tabla N° 2</b> Requisitos microbiológicos del queso fresco según la NTP 202-195.....	11
<b>Tabla N° 3</b> Categoría taxonómica de <i>Escherichia coli</i> .....	18
<b>Tabla N° 4</b> Categoría taxonómica de <i>Enterobacter</i> .....	21
<b>Tabla N° 5</b> Categoría taxonómica de <i>Klebsiella</i> .....	22
<b>Tabla N° 6</b> Categoría taxonómica de <i>Citrobacter</i> .....	23
<b>Tabla N° 7</b> Categoría taxonómica de <i>Serratia</i> .....	24
<b>Tabla N° 8</b> Pruebas bioquímicas de coliformes totales .....	24
<b>Tabla N° 9</b> Rango natural de contaminación de las 6 muestras de quesos no madurados (fresco, lluta, mantecoso, mozzarella, ricotta y serranito) en el medio VRBL frente al CCA .....	43
<b>Tabla N° 10</b> Rango natural de contaminación de las 6 muestras de quesos no madurados (fresco, lluta, mantecoso, mozzarella, ricotta y serranito) en el medio TBX frente al CCA .....	44
<b>Tabla N° 11</b> Estudio de productividad del método alternativo (CCA) frente a un agar no selectivo (TSA) para <i>E. coli</i> y <i>C. freundii</i> .....	46
<b>Tabla N° 12</b> Recuentos obtenidos a partir de los inóculos de <i>E. coli</i> y <i>coliformes totales</i> ( <i>C. freundii</i> y <i>E. coli</i> ) para el estudio de precisión del método alternativo (CCA) bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad del LECC (Analista Y).....	47
<b>Tabla N° 13</b> Recuentos obtenidos a partir de los inóculos de <i>E. coli</i> y <i>coliformes totales</i> ( <i>C. freundii</i> y <i>E. coli</i> ) para el estudio de precisión del método alternativo (CCA) bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad del LECC (Analista M).....	48
<b>Tabla N° 14</b> Estudio de precisión interna del método alternativo (CCA) bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad interna del LECC para <i>E. coli</i> .....	49
<b>Tabla N° 15</b> Estudio de precisión interna del método alternativo (CCA) bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad interna del LECC para coliformes totales .....	49
<b>Tabla N° 16</b> Estudio de veracidad relativa del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (VRBL) para coliformes totales.....	49
<b>Tabla N° 17</b> Estudio de veracidad relativa del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (TBX) para <i>E. coli</i> .....	51
<b>Tabla N° 18</b> Estudio de perfil de precisión del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (VRBL) para coliformes totales.....	53

<b>Tabla N° 19</b> Estudio de perfil de precisión del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (TBX) para <i>E. coli</i> .....	54
<b>Tabla N° 20</b> Crecimiento y color de colonia de las cepas de coliformes y <i>E. coli</i> incubadas en VRBL a 35 °C por 24 h .....	55
<b>Tabla N° 21</b> Crecimiento y color de colonia de las cepas de coliformes y <i>E. coli</i> incubadas en TBX a 44 °C por 24 h .....	56
<b>Tabla N° 22</b> Crecimiento y color de colonia de las cepas de coliformes y <i>E. coli</i> incubadas en CCA a 35 °C por 24 h .....	57
<b>Tabla N° 23</b> Crecimiento y color de colonia de las cepas de coliformes y <i>E. coli</i> incubadas en TSA a 35 °C por 24 h .....	57
<b>Tabla N° 24</b> Crecimiento y color de colonia de las cepas de <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> y <i>Salmonella entérica</i> incubadas en VRBL a 35 °C por 24 h .....	58
<b>Tabla N° 25</b> Crecimiento y color de colonia de las cepas de <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> y <i>Salmonella entérica</i> incubadas en TBX a 44 °C por 24 h .....	59
<b>Tabla N° 26</b> Crecimiento y color de colonia de las cepas de <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> y <i>Salmonella entérica</i> incubadas en CCA a 35 °C por 24 h .....	59



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico N° 1</b> Rango natural de contaminación de las 6 muestras de quesos no madurados (fresco, lluta, mantecoso, mozzarella, ricotta y serranito) en el medio VRBL frente al CCA .....	44
<b>Gráfico N° 2</b> Rango natural de contaminación de las 6 muestras de quesos no madurados (fresco, lluta, mantecoso, mozzarella, ricotta y serranito) en el medio TBX frente al CCA .....	45
<b>Gráfico N° 3</b> Recuento de <i>E. coli</i> en concentración 50 UFC/mL en CCA y TSA .....	46
<b>Gráfico N° 4</b> Recuento de <i>C. freundii</i> en concentración 50 UFC/mL en CCA y TSA ....	47
<b>Gráfico N° 5</b> Recuento de <i>E. coli</i> y <i>C. freundii</i> en concentración 30 UFC/mL en CCA ...	48
<b>Gráfico N° 6</b> Estudio de veracidad relativa del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (VRBL) para coliformes totales interpretados con el método Bland - Altman .....	50
<b>Gráfico N° 7</b> Estudio de veracidad relativa del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (VRBL) para coliformes totales interpretados en el gráfico de dispersión....	51
<b>Gráfico N° 8</b> Estudio de veracidad relativa del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (TBX) para <i>E. coli</i> interpretados con el método Bland - Altman .....	52
<b>Gráfico N° 9</b> Estudio de veracidad relativa del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (TBX) para <i>E. coli</i> interpretados en el gráfico de dispersión .....	52
<b>Gráfico N° 10</b> Estudio de perfil de precisión del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (VRBL) para coliformes totales.....	54
<b>Gráfico N° 11</b> Estudio de perfil de precisión del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (VRBL) para coliformes totales.....	55
<b>Gráfico N° 12</b> Recuento de <i>E. coli</i> y <i>C. freundii</i> en concentración 100 UFC/mL en VRBL .....	56
<b>Gráfico N° 13</b> Recuento de <i>E. coli</i> en concentración 30 UFC/mL en TBX.....	56
<b>Gráfico N° 14</b> Recuento de <i>E. coli</i> y <i>C. freundii</i> en concentración 100 UFC/mL en CCA .....	57
<b>Gráfico N° 15</b> Recuento de <i>E. coli</i> y <i>C. freundii</i> en concentración 100 UFC/mL en TSA	58

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo N° 1</b> Costos de los medios de cultivo y pruebas confirmatorias utilizados en la validación .....	79
<b>Anexo N° 2</b> Ficha técnica del medio de cultivo VRBL .....	80
<b>Anexo N° 3</b> Ficha técnica del medio de cultivo TBX.....	81
<b>Anexo N° 4</b> Ficha técnica del medio de cultivo CCA.....	82
<b>Anexo N° 5</b> Certificado de cepa <i>Escherichia coli</i> WDCM 00013.....	83
<b>Anexo N° 6</b> Certificado de cepa <i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00087.....	84
<b>Anexo N° 7</b> Certificado de cepa <i>Citrobacter freundii</i> WDCM 00006 .....	85
<b>Anexo N° 8</b> Certificado de cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00025.....	86
<b>Anexo N° 9</b> Certificado de cepa <i>Salmonella enterica</i> WDCM 00030.....	87
<b>Anexo N° 10</b> Certificado de cepa <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00034 .....	88
<b>Anexo N° 11</b> Certificado de cepa <i>Staphylococcus saprophyticus</i> WDCM 00159 .....	89
<b>Anexo N° 12</b> Estudio de exclusividad del método alternativo frente a los métodos de referencia con vancomicina .....	90
<b>Anexo N° 13</b> Certificado N° 020902 del medio de cultivo Chromocult Coliform Agar por el programa AOAC Performance Tested.....	91
<b>Anexo N° 14</b> Verificación de los equipos del laboratorio .....	94
<b>Anexo N° 15</b> Control de la autoclave.....	95
<b>Anexo N° 16</b> Ficha técnica de Sterikon plus bioindicador MERCK .....	96
<b>Anexo N° 17</b> Control de ambientes.....	97
<b>Anexo N° 18</b> Verificación de medios de cultivo.....	99
<b>Anexo N° 19</b> Reconstitución de cepas bacterianas WDCM .....	102
<b>Anexo N° 20</b> Revitalización y cuantificación de las cepas bacterianas WDCM .....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCA: Agar para Coliformes Chromocult  
TSA: Agar Triptona Soja  
VRBL: Agar cristal violeta rojo neutro bilis lactosa  
TBX: Agar Triptona BÍlis-X-Glucoronido  
ISO: Organización Internacional de Normalización  
NTP: Norma Técnica Peruana  
UFC: Unidad Formadora de Colonia  
NMP: Número Más Probable  
LECC: Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad  
UCSM: Universidad Católica de Santa María  
MIDAGRI: Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego  
AOAC: Association of Analytical Communities  
DS: Desviación estándar  
CV: Coeficiente de Variación  
Log: Logaritmo  
Sr: Desviación estándar repetibilidad  
Sl: Desviación estándar reproducibilidad  
Ui: Límite superior de intervalo de tolerancia esperado  
Li: Límite inferior de intervalo de tolerancia esperado  
AL: Límite de aceptabilidad  
 $\beta$ -ETI:  $\beta$ -expectativa de intervalo de tolerancia

## INTRODUCCIÓN

Los quesos forman parte de los productos lácteos más consumidos en nuestro país, por lo que es relevante asegurar la inocuidad alimentaria de estos. Entre los microorganismos indicadores de inocuidad están los coliformes totales que están compuestos por los siguientes géneros de la familia *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. La bacteria indicadora de contaminación por materia fecal es la *Escherichia coli*, por lo tanto, el consumidor podría estar expuesto a bacterias entéricas (1).

La alta concentración de bacterias que se encuentran en el queso fresco es primordialmente por las condiciones óptimas de este alimento para el crecimiento de cualquier microorganismo que ingrese al producto con facilidad. El queso fresco actúa como un excelente medio para el desarrollo de bacterias como *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y otros. El desarrollo de estas bacterias en el queso fresco constituye el principal motivo de muchas enfermedades por transmisión alimentaria.

Un gran número de quesos frescos que se venden en Arequipa, especialmente aquellos producidos de manera artesanal, se ofrecen en mercados y en lugares ambulantes. Estos sectores están expuestos a una alta cantidad de microorganismos conllevando una higiene deficiente, por lo que esto supone un peligro para la salud de quienes los consumen (2).

En la actualidad, la comercialización de queso fresco está ampliamente extendida. Esta situación genera una alta preocupación en cuanto a la salud de los consumidores, ya que desde el momento en que inicia el proceso con la extracción de la leche de los animales productores hasta la elaboración, distribución y venta del queso, se evidencia que la infraestructura, los materiales y el manejo de la materia prima, no es la óptima y no cumplen con las regulaciones sanitarias establecidas. Adicionalmente, estos quesos no son sometidos en su mayoría a un método de pasteurización, que significa un riesgo para la salud del consumidor (3).

El análisis de coliformes totales y *E. coli* brinda información de la calidad en los quesos no madurados, así mismo, indica si las prácticas sanitarias durante el proceso de manufactura son correctas. La presencia de estas bacterias en cantidades superiores a las permitidas evidencia una posible contaminación del alimento, favoreciendo así, a la

aparición de bacterias altamente patógenas y el desarrollo de Enfermedades por Transmisión de Alimentos que constituyen una amenaza para la salud del consumidor.

El Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la UCSM se encarga de efectuar ensayos de laboratorio, incluyendo técnicas analíticas generales y específicas como métodos no normalizados, normalizados y métodos propios del laboratorio para determinar la calidad en una extensa variedad de productos con el propósito de otorgar un servicio de calidad a sus clientes con resultados confiables.

Así mismo, la validación de un método es primordial para afirmar la confiabilidad de los resultados en base a un análisis estadístico de cada parámetro establecido según el método, con el objetivo de verificar que el método es idóneo para el uso determinado, además que permite al laboratorio poder obtener una acreditación haciendo uso de sus competencias en diversos tipos de ensayos.

Las instituciones internacionales como la ISO establecen métodos de referencia confiables para la detección cualitativa y cuantitativa de coliformes totales y *E. coli* en alimentos, estos procedimientos indican el uso de medios como VRBL (Cristal violeta rojo neutro bilis lactosa) para coliformes totales y para *E. coli* se emplea el medio TBX (Tryptona-Bilis-X-glucurónido), sin embargo estos análisis se realizan simultáneamente utilizando el medio CCA (Agar para Coliformes Chromocult) para el control microbiológico de aguas según la ISO 9308 (4). Es por ello el interés investigativo para realizar una valoración del medio CCA (Agar para Coliformes Chromocult) como única prueba de análisis microbiológico tanto para coliformes totales como *E. coli*, sobre los quesos no madurados obtenidos de uno los principales mercados de Arequipa que es San Camilo, optimizando así el tiempo y recursos en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María.



# **CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO TEÓRICO**

## 1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1. Determinación del problema

En el LECC de la Universidad Católica de Santa María, una de las muestras de mayor interés para su análisis son los quesos no madurados debido a que estos tienen mayor afluencia en el área de microbiología. De acuerdo con la R.M. N° 591-2008-MINSA, se requiere realizar la enumeración de coliformes totales y *E. coli*, porque son criterios de higiene para considerar si un alimento es óptimo para el consumo humano (5).

Actualmente según la ISO (Organización Internacional de Normalización), para el recuento de coliformes y *E. coli* en alimentos emplean dos medios diferentes, agar VRBL (Cristal violeta rojo neutro bilis lactosa) y agar TBX (Tryptona-Bilis-X-glucurónido) respectivamente; lo cual implica una mayor cantidad de recursos, laboriosidad de los analistas, empleo de placas de Petri y autoclave, del mismo modo más tiempo en la realización del análisis. Así mismo, el uso de dos medios diferentes resulta ser más costoso en comparación de uno (CCA).

Debido a esto, podría resultar mejor el empleo de los medios de cultivo cromogénicos para el recuento de coliformes y *E. coli*, como el CCA (Agar para Coliformes Chromocult) que es un medio selectivo y diferencial para estos microorganismos, sin embargo, se encuentra validado para aguas según la ISO 9308 (4).

Por este motivo, es de interés validar este método en nuestra matriz objetivo para que nos proporcione resultados confiables cumpliendo los parámetros establecidos por la ISO 16140-4, el cual es un protocolo para la validación de métodos alternativos frente a los métodos de referencia (6).

### 1.2. Enunciado del problema

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA COLIFORMES TOTALES Y *Escherichia coli* UTILIZANDO EL MEDIO DE CULTIVO COMERCIAL CROMOGENICO CCA (AGAR PARA COLIFORMES CHROMOCULT), EN QUESOS NO MADURADOS, 2023.

### 1.3. Descripción del problema

#### 1.3.1. Área del conocimiento

- a. **Área general:** Ciencias de la salud
- b. **Área específica:** Farmacia y bioquímica
- c. **Línea o tópico:** Microbiología

#### 1.3.2. Variables

**Tabla N° 1**

Cuadro de variables

Variables	Variable	Indicadores	Unidades
<b>Independientes</b>	Concentración de coliformes totales y <i>E. coli</i> en quesos no madurados.	- Determinación cualitativa de coliformes totales y <i>E. coli</i> .	- P/A
		- Determinación cuantitativa de coliformes totales y <i>E. coli</i> .	- UFC/g
<b>Dependientes</b>	Validación del medio CCA como método alternativo en quesos no madurados.	- Estudio de veracidad relativa. - Estudio de perfil de precisión. - Estudio de precisión interna (repetibilidad y reproducibilidad). - Prueba de inclusividad y exclusividad.	

\* P/A: Presencia/Ausencia      UFC: Unidad Formadora de Colonia

### 1.3.3. Interrogantes básicas

- ¿El recuento en placa de coliformes totales y *E. coli* en quesos no madurados cumplirá con los límites establecidos por la R.M. N° 591-2008-MINSA?
- ¿El método alternativo CCA (Agar para Coliformes Chromocult) cumplirá con los criterios de validación establecidos sobre coliformes totales en comparación con el método de referencia VRBL (Cristal violeta rojo neutro bilis lactosa) en quesos no madurados?
- ¿El método alternativo CCA (Agar para Coliformes Chromocult) cumplirá con los criterios de validación establecidos sobre *E. coli* en comparación con el método de referencia TBX (Tryptona-Bilis-X-glucuronido) en quesos no madurados?
- ¿Se podrá aplicar el método alternativo CCA (Agar para Coliformes Chromocult) en quesos no madurados en el uso rutinario del LECC haciendo uso de un protocolo?

### 1.3.4. Tipo de investigación

Prospectivo transversal comparativo de observación.

## 1.4. Justificación

- Económico: El LECC de la Universidad Católica de Santa María, se verá beneficiado al poder reducir los costos, el tiempo, uso de placas y simplificará el trabajo para los analistas, porque se empleará un mismo medio de cultivo (CCA) evitando el uso de dos medios diferentes (VRBL y TBX) para la cuantificación de coliformes totales y *E. coli*.
- Social: La validación del método alternativo CCA sería útil para optimizar el tiempo de este análisis, ya que las empresas productoras de quesos frescos contratan el servicio del LECC.
- Profesional: Los profesionales químicos farmacéuticos, en nuestra formación, somos capacitados para la validación de métodos microbiológicos. Igualmente permitirá que el LECC siga optimizando su área de microbiología con el objetivo de conseguir la acreditación para los métodos microbiológicos utilizados en el laboratorio.

- Personal: La validación de métodos microbiológicos en el LECC, fue de nuestro interés durante el desarrollo de nuestras prácticas preprofesionales, así mismo queremos contribuir en el laboratorio con la optimización del análisis microbiológico en quesos no madurados, con el fin de que este sea más rápido y confiable. Además, esta investigación va a contribuir a la seguridad sanitaria, ya que al aplicarse va a informar sobre la inocuidad de los quesos no madurados y es por ello nuestra iniciativa de realizar la presente investigación. Por otro lado, el realizar esta investigación nos brindará mayores oportunidades para especializarnos en esta área en un futuro profesional.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Validar un método de recuento en placa para coliformes totales y *Escherichia coli* utilizando el medio de cultivo comercial cromogénico CCA (Agar para Coliformes Chromocult), en quesos no madurados.

### 2.2. Objetivos específicos

- Obtener la muestra de quesos no madurados del mercado San Camilo.
- Realizar el recuento de colonias en placa de coliformes totales y *E. coli* en los métodos de referencia (VRBL y TBX) y alternativo (CCA), y evaluar las diferencias estadísticamente mediante una prueba de ANOVA.
- Evaluar cada parámetro establecido para la validación del método alternativo CCA.
- Realizar un protocolo de análisis de quesos no madurados para el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Queso

##### 3.1.1. Generalidades

La palabra queso proviene del latín “cascas” que significa fermentar. Este producto se caracteriza por ser fresco, se origina por el drenaje de suero que se forma por la coagulación de la leche. Se considera un alimento de mucho valor nutricional, porque contiene proteína de alto valor biológico, grasa, fósforo, calcio, vitamina A y D; sin embargo, también contiene microorganismos que pueden ocasionar afecciones a los consumidores poniendo en riesgo su salud (7).

Es un producto derivado de la leche, que tiene uso en una amplia variedad de comida gastronómica. Aporta textura, sabor y valor nutricional a estas preparaciones. Además, representa una fuente significativa de nutrientes esenciales para la nutrición humana, estas cualidades dependen de la fuente de leche empleada y las condiciones de su elaboración. Por lo tanto, las características nutricionales van a depender de cada tipo de queso ya que son únicas y distintivas.

Con el paso del tiempo, se han mejorado varios procedimientos para la producción del queso, dando lugar a una amplia variedad de productos con el propósito de preservar los nutrientes valiosos que podrían perderse cuando la leche se descompone. Este producto es una parte fundamental de la dieta en varias partes del mundo por su elevado contenido nutricional. A comparación de la leche, los nutrientes presentes en el queso están presentes de forma más concentrada, debido a que en el proceso se elimina el suero de la leche, lo que permite su conservación (8).

En el Perú, la producción de leche por año es de 2 millones 241 toneladas, del cual el 44 % se dirige a la elaboración de queso artesanal y productos lácteos. Según el MIDAGRI en el año 2022 se evidenció 145.765 toneladas de producción nacional de queso en comparación al año 2021, el cual fue de 126.685 toneladas de esta producción. Además, en el año 2022, del total de la producción nacional, el queso fresco corresponde al

mayor porcentaje con un 73 %, luego el queso maduro con 23 %, seguido el mantecoso con 4 %, entre otros.

Es importante señalar que en el Perú hay 388.450 productores de queso, que fabrican más de 50 variedades de este alimento, en mayor cantidad son los quesos artesanales. Dentro de las principales provincias productoras de queso están Puno, Cajamarca, Ayacucho, Arequipa, Huánuco, Moquegua, Huancavelica, Amazonas, Cusco, Piura, Lima, Pasco y Junín.

Según el MIDAGRI, está en ascenso la ingesta de queso en cada peruano, tanto así que en el año 2009 se consumía 2.4 kilos por persona, sin embargo, en la actualidad se consumen 4.7 kilos. Así mismo, la Encuesta Nacional del Consumidor nos indica que el queso representa el segundo derivado lácteo de mayor consumo en el país, dado que aporta un alto valor nutricional al consumidor. El consumo del queso se da con una frecuencia de 2 a 3 veces por semana, siendo la frecuencia de compra una vez a la semana, esto se ve influenciado por el fácil acceso a este alimento, ya que se encuentra en bodegas y mercados (9,7).

### 3.1.2. Clasificación

En el Perú, los quesos se clasifican en base a la NTP 202-193 “Leche y productos lácteos. Queso. Identificación, clasificación y requisitos”.

- a. **Según la consistencia:** extraduro, duro, semiduro y blando.
- b. **Según la cantidad de materia grasa:** extragrasso, grasso, semigrasso, semidescremado y descremado.
- c. **Según el tipo de proceso:** fresco, semimadurado, madurado y madurado por mohos (10).

También se pueden clasificar según el proceso de elaboración y la consistencia de la pasta.

- a. **Según el proceso de elaboración:** se divide en quesos no madurados como Mozzarella, Ucayalino o Cajamarca; en quesos madurados como el parmesano, Amazónico y Cuartirolo; y en quesos fundidos que se caracterizan por ser productos procesados.

**b. Según la consistencia de la pasta:** se clasifica en quesos de pasta blanda el cual su porcentaje de humedad se encuentre entre 52 y 65%, aquí se encuentra el Mozzarella, Mantecoso y el Fresco. Los quesos de pasta semidura que presenta un porcentaje de humedad entre 39 y 51%, aquí se encuentra el Gouda, Paria y Tilsit. Por último, los quesos de pasta dura que contienen un porcentaje de humedad menor al 38%, aquí está el Parmesano, Amazónico y Cheddar (7).

### 3.2. Queso fresco

#### 3.2.1. Generalidades

Se le denomina el queso que se produce en base a la leche pasteurizada, sin pasar por el proceso de maduración, sin corteza y que se encuentra dispuesto para el consumo humano poco después de su elaboración.

Se caracterizan por su alto contenido de humedad; además el cuajado para su fabricación puede ser de tipo enzimático, por acidez con el uso de cultivos lácticos o ácido orgánico, además puede ser blando o duro, magro o graso, con pasta cocida o no. Es importante conocer que el tiempo de durabilidad de este tipo de queso es de treinta días y con refrigeración en un rango de temperatura entre 4°C y 10°C (2).

#### 3.2.2. Clasificación

##### A. Queso fresco tradicional

Aquel queso que se caracteriza por su textura blanda y firme, con un color blanco, no es madurado, es moldeado, una de sus particularidades es que es levemente granular, no contiene cultivos lácteos y es producido por la coagulación de la leche y liberación del suero.

##### B. Queso mozzarella

Se describe como un queso blando, color casi blanco, de textura lisa y elástica, contiene una estructura fibrosa de hebras de proteína de forma paralela, no contiene gránulos de cuajada. Una de sus características es que se puede moldear de diferentes formas.

### C. Queso requesón, queso cottage

Se caracteriza por ser un queso que no presenta corteza, su textura es blanda y granulosa, no es madurado, presenta un color casi blanco y si se evidencia una cubierta con aspecto cremoso.

### D. Queso mantecoso, queso cremoso

Se caracteriza por un contenido alto de materia grasas, su textura es blanda, homogénea, cremosa y no granular, no es madurado ni escaldado, su elaboración se da en base a la crema sola o mezclada con leche, se hace empleo de cultivos lácteos y opcionalmente de enzimas en el proceso de la cuajada (11).

### 3.2.3. Requisitos microbiológicos según la NTP 202-195:

La presente norma describe los parámetros establecidos que debe cumplir el queso fresco para que se encuentre con la inocuidad alimentaria óptima para el consumo humano (11).

**Tabla N° 2**

Requisitos microbiológicos del queso fresco según la NTP 202-195

Agente microbiano	Unidad	Categoría	Clase	n	c	Límite		Método de ensayo
						m	M	
Coliformes	UFC/g	5	3	5	2	5x10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	ISO 4832 AOAC 991.14
<i>Salmonella</i> sp./25 g	Presencia o ausencia/25 g	10	2	5	0	Ausencia	-	ISO 6579-1
<i>Escherichia coli</i>	NMP/g	6	3	5	1	3	10	ISO 16649-3
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFC/g	7	3	5	2	10	10 <sup>2</sup>	ISO 6888-1
<i>Listeria monocytogenes</i>	Presencia o ausencia/25 g	10	2	5	0	Ausencia	-	ISO 11290-1

NOTA:  
Categoría: Grado de riesgo que representa los microorganismos en base a las condiciones de manipulación y consumo humano.  
Clase: Clasificación que se les da los planes de muestreo por atributos, pueden ser de dos o tres.

### 3.2.4. Alteración en el queso fresco

El queso fresco se considera un excelente sustrato propicio para el crecimiento microbiano, adicional a ello, también tiene un alto contenido

de humedad, un alto valor en nutrientes y un pH excelente para el desarrollo de los microorganismos de este alimento.

La microflora del queso va a depender fundamentalmente de la leche y de su pasteurización en su elaboración. Generalmente, entre la flora microbiana presente en el queso fresco se distingue a los coliformes, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, algunos hongos y levaduras también. La degradación de este alimento se basa primordialmente en la microflora natural del queso y la carga microbiana inicial de la leche; estos factores se encuentran directamente relacionados con el desarrollo de las bacterias presentes en el queso fresco y consecuentemente con su deterioro (7).

### **3.2.5. Fuentes microbiológicas contaminantes del queso fresco**

La contaminación del queso proviene de la incorrecta manipulación de la leche y en la fabricación del queso, seguidamente se detallan las principales vías de contaminación.

#### **A. Animal**

La ineficiencia sanitaria en el ordeño influye en la contaminación de la leche porque hay contacto con las mamás del animal productor, además por una incorrecta manipulación, pueden estar presentes los pelos del animal que también son contaminantes.

Así mismo, *Staphylococcus aureus*, un agente patógeno que afecta a la ubre aumenta la contaminación en la leche y también algunas enfermedades en el animal que pueden transmitirse por las vías de la producción de la leche en el animal.

#### **B. Vías externas**

##### **➤ Estiércol y suelo**

Se caracteriza por ser una de las principales fuentes de contaminación, debido a que está en contacto con las mamas del animal y su inadecuada higiene propicia la exposición de microorganismos patógenos, en su mayoría coliformes fecales.

➤ **Agua**

La inocuidad del agua repercute directamente en la contaminación por el lugar de suministro, ya que es contaminada por las fuentes superficiales debido a la actividad de los animales, personas y otros factores. Los microorganismos patógenos pueden encontrarse en el agua, por lo tanto, es importante mantener precauciones en función a estas fuentes de abastecimiento, la alimentación y el entorno de los animales productores para garantizar una excelente calidad de agua.

➤ **Herramientas**

La suciedad presente en las ranuras, espumas y otras superficies que tienen contacto con la leche desempeña un papel importante en este procedimiento. Así mismo, descuidar la limpieza en el material para la elaboración del queso fresco puede dar lugar a la contaminación, lo que, a su vez, afecta en la calidad final del producto. Además, el recipiente que contiene la leche se considera una de las herramientas principales de contaminación, en especial cuando no tiene una higiene correcta, lo que puede propiciar la proliferación de microorganismos.

➤ **Aire y polvo**

El aire puede introducir microorganismos en la leche o en otros componentes del proceso, lo que lo convierte en una fuente de contaminación, ya que el movimiento del aire puede transportar ciertas partículas de suciedad. De igual manera, el polvo representa una fuente adicional de contaminación, ya que puede albergar microorganismos que son transmitidos por el aire. Por lo tanto, es esencial implementar medidas preventivas para evitar que el polvo se deposite en el queso fresco.

➤ **Personal**

Los trabajadores incluidos en el ordeño de los animales o en la fabricación del producto pueden constituir una fuente potencial de contaminación, debido a que las manos y ciertas partes del cuerpo pueden albergar al microorganismo *Staphylococcus aureus*. Así mismo, es esencial que el personal tome precauciones especiales y mantenga buenas prácticas de higiene en el proceso.

➤ **Otras fuentes**

Los insectos también representan una fuente de contaminación al introducir microorganismos potencialmente dañinos (7).

### 3.2.6. Proceso de elaboración

La fabricación del queso fresco requiere insumos específicos para su preparación, de igual forma es de suma importancia mantener inocuo todo el proceso de elaboración para conseguir un producto en condiciones óptimas para su ingesta.

#### A. Insumos

➤ **Leche**

Es un componente fundamental en la producción del queso fresco debido a su contenido de lactosa y caseína, que representa aproximadamente el 80 % del nitrógeno presente en este ingrediente.

➤ **Cuajo**

Está compuesto por quimosina, que es una enzima liberada por el estómago de los terneros, se emplea para separar el agua de los sólidos en la leche. La acción de esta enzima es directamente con la caseína, esto provoca la unión de los sólidos de la leche en forma de gel. A medida que este gel se contrae, expulsa el suero, separando entre un 50 % y 90 % la cantidad de agua presente en la leche.

➤ **Sal**

Se emplea para dar forma y afecta el proceso de eliminación del suero, lo que a su vez tiene un impacto en la cantidad de humedad del queso. Este componente ejerce una influencia significativa en las características del queso al tener efectos sobre las bacterias involucradas en su elaboración.

#### B. Etapas de elaboración

➤ **Recepción**

La leche debe cumplir con los criterios de calidad, tanto como en términos químicos como microbiológicos. Debe poseer la acidez necesaria y estar exenta de impurezas, por lo que se requiere un proceso de filtración para eliminar cualquier sustancia ajena.

➤ **Pasteurizado**

Se puede definir como un proceso sanitario diseñado para eliminar por completo la microflora bacteriana presente en la leche, con ello se reduce significativamente la actividad enzimática que puede causar el deterioro. Es un paso esencial en la fabricación de los quesos frescos, existen dos tipos de pasteurización, como la lenta que consta de 30 minutos a 63 - 65 °C y la rápida de 15 segundos a 72 °C.

➤ **Enfriado**

El propósito de este paso es preparar la leche de manera que mejore la productividad y promueva la creación del cuajo.

➤ **Coagulación**

Se define como el resultado de la alteración de las proteínas y se puede realizar de dos maneras: Usando enzimas proteolíticas ácidas, como la quimosina que da lugar a la coagulación enzimática, esta consta de dos etapas, la primera que se caracteriza por la hidrólisis de la k-caseína que conduce a la desestabilización de las micelas de caseína, formando micelas para-k-caseína. En la segunda etapa, que dependen del calcio, ocasiona la agrupación y precipitación de las micelas para-k-caseína. Con el tiempo, se desarrolla una estructura en forma de red con poros, donde se incorporan los glóbulos de grasa, y el coágulo se fortalece debido a la formación continua de enlaces entre las micelas. Este proceso final necesita que la mezcla repose y se encuentre a una temperatura por encima de los 20°C y también reduciendo el pH a un valor isoelectrónico de las proteínas.

➤ **Cortado y batido**

Durante este proceso, es esencial evitar que se rompa el coágulo, ya que esto significaría pérdida de materia grasa y un deficiente coagulado. Como recomendación para la preparación de los quesos, se sugiere cortar la cuajada en cubos con medida de 1 a 2 cm, procurando que el corte sea uniforme para incrementar la superficie de contacto y permitir que el suero salga en la mayor cantidad posible. Además, batir la cuajada a una temperatura entre 38 - 40°C contribuye a mejorar el coagulado y facilitar la liberación del suero.

➤ **Desuerado**

Implica la separación del suero mediante filtración o decantación. Se pueden llevar a cabo dos etapas de desuerado. En la primera fase, se elimina alrededor del 35 % y 50 % del lactosuero, dejando el suero restante adecuado para la incorporación directa de sal, que favorece la homogeneización.

➤ **Salado**

Se realiza para alcanzar el sabor deseado en el queso fresco, así mismo facilita la eliminación del suero. Además, cumple una función conservante al inhibir el crecimiento de bacterias indeseables, especialmente cuando se utiliza en concentraciones más altas.

➤ **Moldeado**

Tiene como finalidad que los coágulos se adhieran para una masa íntegra, lo que determina la textura y la forma final del queso fresco.

➤ **Almacenado**

Es importante la refrigeración, para que el queso alcance su punto óptimo en términos de textura y presentación. Se recomienda mantenerlo a una temperatura entre 4 y 7 °C, para inhibir el crecimiento de microorganismos evitando el deterioro del producto. La duración de la frescura del queso varía y está influenciada por la producción, especialmente la pasteurización, enfriamiento de la leche y almacenamiento del producto final (3).

### 3.3. Microorganismos contaminantes

#### 3.3.1. Coliformes

El término coliforme engloba a microorganismos con características bioquímicas similares y con una relevancia importante como indicadores de contaminación en alimentos y agua. Este nombre se deriva de la bacteria principal de este grupo, *Escherichia coli*. Este grupo pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, no producen esporas y son Gram negativas aerobias y anaerobias facultativas. Se encuentran de manera natural en la

microbiota intestinal del ser humano, en animales de sangre caliente, en el agua, suelo y vegetación (13).

Este grupo familiar comprende 41 géneros y más de 100 especies. Estos microorganismos pertenecen al grupo de gamma proteobacterias y se presentan como bacilos rectos de tinción Gram negativa. Pueden ser móviles gracias a los flagelos peritricos o inmóviles. Tienen requisitos nutricionales simples por lo que no necesitan de sodio para crecer y normalmente reducen el nitrato a nitrito (12).

### 3.3.2. Coliformes totales

#### A. Definición

Son un grupo de bacterias Gram-negativas, aerobias o anaerobias facultativas en presencia de sales biliares, que no forman esporas, tienen forma de bastoncillos que fermentan la lactosa a temperatura de 35 a 37 ° C, forman ácido y gas (CO<sub>2</sub>) en 24 h, son oxidasa negativa, y tienen actividad enzimática β-galactosidasa (14). Está compuesto por bacterias entéricas como *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. La cuantificación de estas puede ser de utilidad para confirmar el saneamiento del agua y los entornos de procesamiento de alimentos (15).

Es importante destacar que, de estas bacterias, *Escherichia coli* es la única que forma parte del tracto intestinal humano y de animales de sangre caliente, mientras que los otros microorganismos pueden hallarse en vegetales y en el suelo.

En este sentido, la R.M N° 591-2008-MINSA, ha dividido los microorganismos en tres grupos distintos, que son: indicadores de alteración (categoría 1, 2 y 3), indicadores de higiene (categoría 4, 5 y 6) y los patógenos (categorías del 7 al 15), donde los coliformes totales se encuentran dentro del grupo de indicadores de higiene (13).

#### B. Clasificación

##### ➤ Fermentación de lactosa con rapidez

##### ❖ *Escherichia coli*

- **Definición:** Es un coliforme que produce indol a partir del triptófano a una temperatura de  $44 \pm 0,5$  °C en  $(21 \pm 3)$  h,

da un resultado positivo en la prueba del rojo de metilo, es incapaz de producir acetil-metil carbinol y no emplea citrato como única fuente de carbono. Su presencia podría estar asociada principalmente con la contaminación fecal (16).

- **Hábitat:** Esta bacteria es habitualmente encontrada en el sistema gastrointestinal. y aunque en su mayoría se consideran inofensivas, existen ciertos serotipos altamente patógenos capaces de causar enfermedades muy graves. También se encuentra en los alimentos, por lo que es importante garantizar la inocuidad de estos para prevenir alguna infección alimentaria (17,18).
- **Taxonomía:**

**Tabla N° 3**

Categoría taxonómica de *Escherichia coli*

Dominio	Bacteria.
Reino	Bacteria.
Filo	Proteobacteria.
Clase	Gamma proteobacteria.
Orden	Enterobacteriales.
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i> .
Género	<i>Escherichia</i> .
Especie	<i>Escherichia coli</i> .

- **Clasificación filogenética:** Principalmente se divide en cuatro grupos denominados A, B1, B2 y D. De esta forma, las cepas de *E. coli* que son virulentas fuera del intestino, se ubican en el grupo B2, y en menor medida, en el grupo D. En contraste, la mayoría de las cepas se encuentran en el grupo A. Cabe destacar, que las cepas del grupo B2 poseen una mayor capacidad para permanecer en el tracto intestinal en comparación con otras cepas.
- **Enfermedades clínicas:** Pueden ser responsables de una variedad de enfermedades, incluyendo septicemia,

infecciones del tracto urinario y episodios de diarrea.

Las cepas que ocasionan diarrea son agrupadas en seis categorías:

- ***E. coli* enteropatógena (EPEC):** es la causa principal de la diarrea infantil en naciones menos desarrolladas. Esta infección se caracteriza por la habilidad de las bacterias para adherirse a las células epiteliales del intestino delgado y posteriormente destruir las microvellosidades. La sintomatología se representa por la diarrea aguda leve o grave, con vómito y fiebre baja.
- ***E. coli* enterotoxígena (ECET):** esta cepa afecta principalmente a niños pequeños que residen en países en vías de desarrollo o a aquellos que viajan a estas localidades. La principal vía de adquisición de estas infecciones es mediante la ingesta de alimentos o agua contaminada con materia fecal, y no se produce una transmisión directa de persona a persona. Los síntomas típicos de esta infección incluyen una diarrea repentina que no presenta sangre, moco ni pus. Ocasionalmente, puede ocurrir fiebre y vómitos.
- ***E. coli* enterohemorrágica (ECEH):** son las responsables más frecuentes de infecciones en naciones desarrolladas. La gravedad de esta infección puede variar desde una diarrea leve hasta una colitis hemorrágica que se caracteriza por dolor abdominal y diarrea con sangre. En algunas personas, se puede presentar fiebre leve o febrícula, y también puede llevar al desarrollo del síndrome urémico hemolítico (SUH). Es más común durante los meses cálidos y afecta en su mayoría a niños menores de 5 años. Muchas veces esta infección se debe al consumo de productos cárnicos poco cocidos, así como al consumo de agua, leche no pasteurizada, jugo de frutas, verduras

crudas y frutas.

- ***E. coli* enteroinvasiva (ECEI):** esta cepa se identifica como la causante de la diarrea disentérica. Se encuentra de forma endémica en muchos países en desarrollo, y su patrón epidemiológico tiene cierta similitud con la Shigelosis. Tiene la capacidad de invadir y dañar el revestimiento del color, lo que conduce a una diarrea acuosa. Pocas veces, la enfermedad puede evolucionar hacia una forma disentérica, que se describe con fiebre, cólicos abdominales, diarrea con presencia de sangre y leucocitos en las heces.
- ***E. coli* enteroagregativa (ECEA):** son asociadas con episodios de diarrea acuosa que persiste y conduce a la deshidratación, especialmente en niños menores de 2 años, así como personas que han viajado a zonas en vías de desarrollo. Además, están relacionadas con casos de diarrea crónica y tienen la capacidad de provocar diarrea persistente (18).

#### ❖ ***Enterobacter***

- **Definición:** forma parte del género *Enterobacter*, es un microorganismo en forma de bacilo que mide aproximadamente 2 micrómetros de longitud y que pertenece al grupo de las bacterias Gram negativas del tipo anaerobio facultativo (20).
- **Hábitat:** se encuentra generalmente en la piel del ser humano, las plantas, los suelos, el agua, el tracto intestinal y en algunos derivados lácteos.

- **Taxonomía:**

**Tabla N° 4**  
Categoría taxonómica de *Enterobacter*

Dominio	Bacteria.
Reino	Bacteria.
Filo	Proteobacteria.
Clase	Gamma proteobacteria.
Orden	Enterobacteriales.
Familia	<i>Enterobacteriaceae.</i>
Género	<i>Enterobacter.</i>

- **Enfermedades clínicas:** Las infecciones más comunes causadas por esta bacteria se presentan en vías respiratorias inferiores, en la piel, en el tracto urinario, endocarditis, dentro de la cavidad abdominal, artritis séptica, osteomielitis e infecciones oculares (21).

❖ ***Klebsiella***

- **Definición:** pertenece al género *Enterobacter*, se caracteriza por tener una cápsula de gran tamaño, no tiene movilidad, es Gram negativo y anaerobio facultativo. Además, es capaz de producir la enzima lisina descarboxilasa, pero no la ornitina descarboxilasa, y suelen dar un resultado positivo en la prueba de Voges Proskauer.
- **Hábitat:** se encuentra en el entorno natural, especialmente en aguas residuales y superficiales, en el suelo y en las plantas. En los seres humanos se ubica en mayor proporción en el sistema respiratorio, en las heces, en la boca, en la piel y en el tracto intestinal.
- **Taxonomía:**

**Tabla N° 5**  
Categoría taxonómica de *Klebsiella*

Dominio	Bacteria.
Reino	Bacteria.
Filo	Proteobacteria.
Clase	Gamma proteobacteria.
Orden	Enterobacteriales.
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i> .
Género	<i>Klebsiella</i> .

- **Enfermedades clínicas:** causante de neumonías bacterianas, además puede provocar una consolidación pulmonar necrosante debido a una hemorragia prolongada. Asimismo, es responsable de infecciones urinarias y bacteriemia en pacientes inmunodeficientes. Se caracteriza por estar entre las principales bacterias responsables de infecciones hospitalarias (23, 24).

➤ **Fermentación de lactosa con lentitud**

❖ *Citrobacter*

- **Definición:** es un bacilo Gram-negativo de 0,3 - 1,0 µm de ancho x 0,6 - 6 µm de largo, tiene movilidad, se caracteriza por ser anaerobio facultativo y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (24).
- **Hábitat:** *Citrobacter* es una bacteria ampliamente distribuida en la naturaleza, generalmente en el suelo y en el agua, también se localiza en el tracto gastrointestinal de los seres humanos. Por lo general, se considera un microorganismo saprófito, pero puede causar enfermedades en personas con el sistema inmunológico comprometido (23).
- **Taxonomía:**

**Tabla N° 6**  
Categoría taxonómica de *Citrobacter*

Dominio	Bacteria.
Reino	Bacteria.
Filo	Proteobacteria.
Clase	Gamma proteobacteria.
Orden	Enterobacteriales.
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i> .
Género	<i>Citrobacter</i> .

- **Enfermedades clínicas:** es la bacteria responsable de causar infecciones en el tracto urinario, en los huesos, en el tracto respiratorio, intraabdominales, peritonitis, bacteriemias y septicemias. A pesar de su amplia presencia en la naturaleza, no suele causar infecciones con facilidad, excepto en personas inmunocomprometidas. Además, *Citrobacter* tiende a desarrollar rápidamente resistencia a varios antibióticos (22,25).

❖ ***Serratia***

- **Definición:** se caracteriza por ser anaerobio facultativo, Gram-negativo y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Las especies del género *Serratia* se destacan entre las enterobacterias debido a su capacidad para generar tres enzimas hidrolíticas como la lipasa, gelatinasa y DNAsa.
- **Hábitat:** la mayoría de las variedades pertenecientes al género *Serratia* se hallan en diversos entornos, incluyendo el medio ambiente, el suelo y los reservorios de animales. En el ser humano, se encuentra en áreas como el revestimiento intestinal, las vías respiratorias, el tracto urinario, heridas y otras áreas. Además, en el entorno hospitalario, se pueden encontrar en instalaciones y fuentes como el suministro de agua, las tuberías y los suministros médicos. Se caracteriza

por ser patógenos oportunistas (22).

- **Taxonomía:**

**Tabla N° 7**  
Categoría taxonómica de *Serratia*

Dominio	Bacteria.
Reino	Bacteria.
Filo	Proteobacteria.
Clase	Gamma proteobacteria.
Orden	Enterobacteriales.
Familia	<i>Enterobacteriaceae.</i>
Género	<i>Serratia.</i>

- **Enfermedades clínicas:** estas bacterias tienen la capacidad de provocar infecciones en el tracto urinario, en las vías respiratorias, en quemaduras, en heridas y en el torrente sanguíneo dando lugar a bacteriemias y septicemias. También causa infecciones a través de catéteres venosos (26).

**C. Pruebas bioquímicas confirmatorias**

**Tabla N° 8**  
Pruebas bioquímicas de coliformes totales

Género	M	F glucosa	F lactosa	Formación de H <sub>2</sub>	Formación de indol	Formación de acetoina	Proteólisis	Utilización de urea
<i>Escherichia</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	-	+	+	+	-	+	-	+
<i>Enterobacter</i>	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Citrobacter</i>	+	+	+	+	+	-	-	+

\* M: Motilidad, F: Fermentación, adaptado de *Lopardo (2018) (22)*

### 3.4. Análisis microbiológico para coliformes totales y *E. coli* en alimentos según la ISO 4832 y 16649

#### 3.4.1. Medio de cultivo de referencia VRBL (Cristal violeta rojo neutro bilis lactosa)

En la ISO 4832 (Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de coliformes: Técnica de recuento de colonias) se describe este medio que tiene como fundamento la capacidad de los coliformes de fermentar la lactosa.

Está compuesto de peptona, extracto de levadura como fuente de vitaminas del grupo B, lactosa como carbohidrato fermentable, sales biliares y cristal violeta para inhibir las bacterias Gram-positivas, rojo neutro como indicador de pH, cloruro de sodio para el transporte y el equilibrio osmótico.

Los fermentadores de lactosa forman colonias rojas con halos de color rojo púrpura. Las colonias típicas de coliformes son rojas purpúreas y con un diámetro (a veces rodeadas por una zona rojiza de bilis precipitada), no requieren confirmación adicional (28).

#### 3.4.2. Medio de cultivo de referencia TBX (Tryptona-Bilis-X-glucurónido)

En la ISO 16649-2 describe este medio que se fundamenta en la escisión del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido (X- $\beta$ -D-glucurónido) en presencia de la enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa que es característica de *E. coli*.

El medio contiene peptona de caseína que brinda nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el desarrollo. El crecimiento de la flora Gram-positiva acompañante se inhibe en gran medida por el empleo de sales biliares y la alta temperatura de incubación de 44 °C.

El resultado de la actividad enzimática glucuronidasa intracelular al romper el vínculo entre el cromóforo y el glucurónido produce que las colonias de *E. coli* adquieran un color característico azul verdoso (29).

### **3.5. Análisis microbiológico para coliformes totales y *E. coli* en aguas según la ISO 9308**

#### **3.5.1. Medio de cultivo alternativo CCA (Agar para Coliformes Chromocult)**

El medio cromogénico CCA permite la detección, diferenciación y enumeración simultánea de *E. coli* y coliformes totales en agua potable.

Se fundamenta en el recuento de coliformes por su enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, que escinde el sustrato Salmon-GAL y en el recuento de *E. coli* por la escisión de los sustratos X-glucurónido y Salmon-GAL por sus enzimas  $\beta$ -D-glucuronidasa y  $\beta$ -D-galactosidasa respectivamente.

Su formulación contiene peptonas, piruvato, sorbitol y tampón de fosfato para apoyar el crecimiento rápido de colonias, heptadecilsulfato de sodio (Tergitol® 7) como inhibidor de las bacterias grampositivas y algunas bacterias Gram-negativas sin efecto negativo sobre el desarrollo de las bacterias coliformes y *E. coli* objetivo.

El resultado de la interacción enzima-sustrato se evidenciará por la aparición de diferentes colores en las colonias, en el caso de coliformes serán de color rojo salmón, y en *E. coli* color azul oscuro a violeta (30).

### **3.6. Normativa nacional sanitaria**

La “Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano (R.M. N° 591-2008-MINSA)”, decreta las condiciones microbiológicas de calidad sanitaria e inocuidad que deben cumplir las bebidas y los alimentos naturales, elaborados o procesados, para que puedan ser considerados como aptos para el consumo humano.

En la norma se agrupa a los alimentos en base a su origen, tecnología de elaboración y consumidor; en el grupo “Leche y productos lácteos” se encuentran los quesos no madurados, que consideran como criterios microbiológicos a los microorganismos indicadores de higiene que son los coliformes totales (5).

### **3.7. Validación**

Se define como un grupo de procesos desarrollados para confirmar mediante un

análisis y evidencias objetivas que cumplan con ciertos criterios para el uso específico previsto de los procedimientos analíticos (31).

Además, establece características de funcionamiento de un método y suministra evidencias tangibles para confirmar el cumplimiento de los estándares de funcionamiento para su aplicación prevista (32).

### 3.7.1. Tipos de validación

**a. Validación concurrente:** se trata de una evaluación en curso del proceso, demostrando y estableciendo pruebas documentales de que tal proceso sigue las directrices adecuadas basadas en la información recopilada durante su implementación real. Tiene relevancia este tipo de validación cuando se han modificado etapas del proceso, ya que proporciona datos para corregir el proceso.

**b. Validación prospectiva:** este tipo de validación se realiza antes de llevar a cabo un método o proceso, permitiendo que las revisiones anticipadas influyan en las características del método. Su principal objetivo radica en prever errores y reducir el riesgo de que ocurran durante la ejecución del proceso.

**c. Validación retrospectiva:** consiste en validar un proceso que ya ha estado en marcha durante algún tiempo, basándose en datos de producción, pruebas y control. Durante esta validación, se revisa el historial de documentos como los controles de las materias primas, el control ambiental, el estado de los equipos, los procedimientos y los métodos analíticos, entre otros (33).

### 3.7.2. Parámetros de validación

**a. Productividad:** Se refiere al porcentaje de éxito en la recuperación de un microorganismo específico en función de un medio de cultivo en condiciones definidas y específicas (49).

**b. Precisión interna:**

- **Repetibilidad interna:** se define como la precisión en la medición de un conjunto específico de condiciones repetibles dentro de un laboratorio específico. Las condiciones en este

parámetro de validación abarcan aspectos como la aplicación del mismo procedimiento de medición, la participación de los mismos técnicos, el uso del mismo sistema, el uso de las mismas condiciones operativas, la misma ubicación y la obtención de mediciones duplicadas en muestras idénticas o similares en un breve periodo de tiempo en el laboratorio determinado.

- **Reproducibilidad interna:** se describe como la precisión de la medición en el marco de un conjunto específico de condiciones reproducibles dentro de un laboratorio específico. En este parámetro las condiciones involucran aspectos como la participación de diferentes técnicos, la aplicación de diferentes condiciones operativas y la obtención de mediciones duplicadas en muestras idénticas o similares durante un periodo de tiempo más extenso en un laboratorio específico (6).

**c. Veracidad relativa:** Hace referencia al nivel de concordancia entre las respuestas obtenidas mediante el método de referencia y el método alternativo en una muestra idéntica.

**d. Perfil de precisión:** Está definido como una representación gráfica en base a la capacidad de medición de un método cuantitativo, obtenida al combinar intervalos de aceptabilidad e intervalos de tolerancia, ambos relacionados con diferentes niveles del valor de referencia.

**e. Estudio de inclusividad:** Se describe como una investigación que implica el uso de cepas objetivo-puras que serán detectadas o enumeradas según el método alternativo.

**f. Estudio de exclusividad:** Se define como una investigación que involucra cepas puras no objetivo, que pueden considerarse por tener potencialmente reactividad cruzada, pero no se espera que sean detectadas o enumeradas mediante el método alternativo (32).

### 3.7.3. Requisitos para la validación del método

#### a. Instalaciones y condiciones ambientales

Para asegurar los resultados de la validación, es esencial considerar los siguientes aspectos.

- Observar, regular y documentar las condiciones del entorno.
- Evitar la contaminación que pueda propagarse.
- Establecer la delimitación de áreas y gestionar su acceso.
- Programar evaluaciones ambientales y de superficie.

#### b. Monitoreo ambiental

La calidad microbiológica del aire y las superficies en el laboratorio son marcadores esenciales que demuestran la efectividad de los análisis efectuados, por ello, se sugiere llevar a cabo los siguientes controles microbiológicos.

- Monitorear la calidad del aire exponiendo placas de cultivo.
- Analizar la calidad microbiológica de las superficies de trabajo haciendo uso de gasas.
- Supervisar la cantidad y la higiene personal.

Es primordial limpiar y desinfectar el área de trabajo donde se efectúa el procedimiento. Esto permite al laboratorio tener un nivel mínimo y constante de contaminación en los suelos y en las áreas donde se recolectan las muestras (33).

#### c. Control de la autoclave

Para realizar la verificación de una suficiente esterilización de la autoclave, se lleva a cabo un control con un bioindicador que contiene esporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953.

El ensayo de control consiste en colocar la ampolla en los lugares con condiciones más desfavorables para esterilizar dentro la autoclave junto con material de trabajo, bajo el parámetro de tiempo a 15 minutos y temperatura a  $121^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , al culminar el proceso, la ampolla se lleva a incubar a  $60^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. De la misma manera se incuba una ampolla no esterilizada como control. Se determina el éxito de esterilización si no hay crecimiento de

*Geobacillus stearothermophilus*, esto se identifica si no hay viraje del indicador de pH manteniendo un color rojo a violeta rojizo (34).

#### 4. HIPÓTESIS

Dado que, el medio de cultivo CCA es utilizado para el recuento de coliformes totales y *E. coli* en agua, es probable que, se valide este medio para el análisis de los mismos microorganismos en quesos no madurados.





## **CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. CAMPO DE VERIFICACION

### 1.1. Ubicación espacial

**a. Ámbito espacial:** El presente trabajo se realizó en la Universidad Católica de Santa María, ubicado en la región de Arequipa.

**b. Ámbito específico:** La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad H - 405.

### 1.2. Ubicación temporal

El periodo de experimentación y análisis de datos de la presente investigación se realizó entre los meses de febrero y septiembre del año 2023.

### 1.3. Unidades de estudio

Quesos no madurados (fresco, lluta, mantecoso, mozzarella, ricotta y serranito) del mercado San Camilo del departamento de Arequipa.

### 1.4. Identificación de los grupos

Los quesos fueron analizados macroscópicamente con las características particulares de cada tipo para su identificación.

### 1.5. Control de los grupos

#### a. Criterios de inclusión

- Quesos no madurados con un tiempo máximo de 2 días desde su producción.
- Quesos no madurados que se expenden en el mercado San Camilo.

#### b. Criterios de exclusión

- Quesos no madurados provenientes de otros mercados de Arequipa.
- Quesos no madurados con un tiempo mayor de 2 días desde su producción.

## 2. MATERIALES

### 2.1. Instrumentos

- Cabina de bioseguridad de flujo laminar vertical.
- Homogeneizador.

- Microondas.
- Balanza analítica.
- Aparato para esterilización en seco (horno).
- Aparato para esterilización en húmedo (autoclave).
- Incubadoras, capaces de operar a  $44\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .
- Incubadora, capaz de operar a  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  o  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .
- Baño de agua, capaz de mantenerse entre  $44\text{ °C}$  y  $47\text{ °C}$ .
- Pipetas y micropipetas, de descarga total, de boca ancha y de capacidad nominal de 1 mL y 10 mL, graduadas respectivamente en divisiones de 0,1 mL y 0,5 mL.
- pH-metro, capaz de medir con una precisión de 0,1 unidades de pH a  $25\text{ °C}$ .
- Equipo de conteo de colonias.

## 2.2. Medios y reactivos

- Agar CCA (Agar para Coliformes Chromocult).
- Agar TBX (Agar Triptona-Bilis-X-glucurónido).
- Agar VRBL (Agar Cristal violeta rojo neutro bilis lactosa).
- Agar TSA (Agar Triptona Soja).
- Agar OGYE (Agar Oxitetraciclina, Glucosa y Extracto de levadura).
- Agar PC (Agar Plate Count).
- Agar nutritivo.
- Caldo Soya Tripticasa.
- Caldo verde brillante bilis lactosa.
- Caldo peptonado tamponado: Peptona, cloruro de sodio, fosfato de hidrógeno disódico dodecahidrato, fosfato dihidrógeno de potasio.
- Reactivo Oxidasa.
- Reactivo Indol.
- Tween 80.
- Alcohol  $70\text{ °}$ .
- Agua destilada.
- Hipoclorito de sodio.

### 2.3. Materiales biológicos

Las cepas fueron proveídas por el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María para la presente investigación.

- *Escherichia coli* WDCM 00013.
- *Enterococcus faecalis* WDCM 00087.
- *Citrobacter freundii* WDCM 00006.
- *Pseudomona aeruginosa* WDCM 00025.
- *Salmonella entérica* WDCM 00030.
- *Staphylococcus aureus* WDCM 00034.
- *Staphylococcus saprophyticus* WDCM 00159.

### 2.4. Materiales

- Tubos de Durham.
- Tubos de ensayo 16 mm x 160 mm.
- Botellas o matraces para ebullición de medios de cultivo.
- Placas de Petri, de diámetro 90 mm a 100 mm.
- Asa de platino-iridio o níquel-plomo, de 3 mm de diámetro aprox. o asas desechables.
- Puntas estériles.
- Portaobjetos.
- Tubos de ensayos con tapa estériles y del mismo volumen.
- Mechero Bunsen.
- Gradillas.
- Espátulas.
- Cucharas para recoger la muestra.
- Bolsas estériles.
- Vasos precipitados.
- Guantes de nitrilo.
- Jeringas estériles descartables.
- Filtros descartables de 0.45  $\mu$ m.
- Algodón.
- Gasas.

## 2.5. Muestra

La muestra son 6 tipos de quesos no madurados (fresco, lluta, mantecoso, mozzarella, ricotta y serranito) en base a la ISO 16140-4 y la Norma Técnica Peruana NTP 202.193:2020 las cuales los definen como quesos obtenidos a partir de leche pasteurizada que no tuvieron el proceso de maduración, además no presentan corteza y están listos para su consumo poco después de su fabricación.

## 2.6. Otros materiales

- Laptop.
- Material de impresión.
- Material de escritorio.
- Material fotográfico.
- Registro de apuntes.

## 3. METODOLOGÍA

### 3.1. Obtención y tratamiento de la muestra

#### 3.1.1. Se obtuvo las muestras de quesos no madurados según la ISO 707

- Se recogió en un solo corte de tiempo en el mercado San Camilo con un tiempo máximo de 2 días desde su producción.
- Se colocó cada muestra de queso no madurado en una bolsa estéril para evitar la contaminación.
- Se transportó al LECC, con su respectivo nombre y se almacenaron a 4 °C para su conservación.
- Se analizó estadísticamente mediante un análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo.

#### 3.1.2. Se trató la muestra de quesos no madurados según la ISO 6887-5

- Se pesó 10 g de muestra en el recipiente estéril con una balanza analítica.
- Se agregó 90 mL del diluyente de peptona tamponado con 0.4 mL de Tween 80 para conseguir una muestra homogénea.
- Se llevó el recipiente al Stomacher durante 30 segundos a una

revolución de 4000 rpm.

- Se colocó todo el contenido en un frasco con rosca proveniente del diluyente.
- Se transfirió 1 mL del frasco con rosca a un tubo con 9 mL de diluyente de peptona tamponado para realizar las diluciones correspondientes para cada tipo de queso no madurado.

### **3.2. Recuento de colonias en placa de coliformes totales y *E. coli* en los métodos de referencia (VRBL y TBX) y alternativo (CCA)**

#### **3.2.1. Se realizó el recuento de colonias en placa de coliformes totales por el método horizontal utilizando el método de referencia VRBL (Cristal violeta rojo neutro bilis lactosa) según la ISO 4832**

- Se inoculó a una placa Petri estéril 1 mL de la dilución correspondiente y se realizó las réplicas según se estableció en el parámetro de validación.
- Se vertió en cada placa Petri aproximadamente 15 mL del medio, previamente se atemperó a 44 °C - 47 °C.
- Se mezcló con cuidado el inóculo con el medio y se dejó solidificar en las placas Petri sobre una superficie horizontal fría.
- Se preparó una placa control con 15 mL del medio para comprobar su esterilidad.
- Después de la solidificación completa, se vertió alrededor de 4 mL del medio VRBL en la superficie.
- Se invirtió las placas inoculadas en una incubadora a 30 °C - 37 °C durante un periodo de 24 h +/- 2h.
- Después del período de incubación especificado, se seleccionaron las placas Petri que contenían entre 10 y 150 colonias.
- Se empleó el equipo de recuento de colonias para identificar las colonias de color rojo púrpura con un diámetro de al menos 0,5 mm (a veces rodeadas por una zona rojiza de bilis precipitada) que se consideran colonias típicas de coliformes y no requieren confirmación adicional.
- Se empleó el equipo de recuento de colonias para identificar las

colonias atípicas y todas las colonias derivadas de productos lácteos que contengan azúcares distintos de la lactosa, para su posterior confirmación.

- Se realizó la confirmación por producción de gas empleando el caldo verde brillante bilis lactosa.
- Se inocularon cinco colonias de cada tipo atípico en tubos con 10 mL de caldo verde brillante de lactosa y bilis con tubos de Durham.
- Se incubaron los tubos a 30 °C - 37 °C durante un periodo de 24 h +/- 2 h.
- Se consideró como coliformes las colonias que mostraron formación de gas en el tubo de Durham.

**3.2.2. Se realizó el recuento de colonias en placa de *E. coli* por el método horizontal utilizando el método de referencia TBX ((Triptona-Bilis-X-glucurónido) según la ISO 16649**

- Se inoculó a una placa Petri estéril 1 mL de la dilución correspondiente y se realizó las réplicas según se estableció en el parámetro de validación.
- Se vertió en cada placa Petri aproximadamente 15 mL del medio TBX, previamente se atemperó a 44 °C - 47 °C.
- Se mezcló con cuidado el inóculo con el medio y se dejó solidificar en las placas Petri sobre una superficie horizontal fría.
- Se invirtió las placas inoculadas en una incubadora a 43 °C - 45 °C durante un periodo de 20 h - 24 h +/- 2h.
- Se empleó el equipo de recuento de colonias para identificar las colonias típicas de color azul o verdeazuladas, que indican la presencia de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa positiva y se hizo el recuento de las UFC típicas.

**3.2.3. Se realizó el recuento de colonias en placa de coliformes totales y *E. coli* por el método horizontal utilizando el método alternativo CCA (Agar para Coliformes Chromocult) según la ISO 9308**

- Se inoculó a una placa Petri estéril 1 mL de la dilución correspondiente

y se realizaron las réplicas según se estableció en el parámetro de validación.

- Se vertió en cada placa Petri aproximadamente 15 mL del medio CCA, previamente se atemperó a 44 °C - 47 °C.
- Se mezcló con cuidado el inóculo con el medio y se dejó solidificar en las placas Petri sobre una superficie horizontal fría.
- Se invirtió los platos inoculados en una incubadora a 36 °C +/- 2 °C durante un periodo de 21 h +/- 3 h.
- Se empleó el equipo de recuento de colonias para identificar las colonias típicas de coliformes que no son *E. coli* con reacción positiva de  $\beta$ -D-galactosidasa (rosado a rojo) y también las que presentan reacción positiva de  $\beta$ -D-galactosidasa y  $\beta$ -D-glucuronidasa (azul oscuro a violeta) como *E. coli*.
- Se realizó la confirmación para la presunción de bacterias coliformes que no son *E. coli* usando una prueba de oxidasa comercial.
- Se hizo la prueba a 10 colonias de color rosa a rojo seleccionadas.
- Las colonias se transfirieron utilizando un asa de inoculación de plástico o platino.
- Una reacción oxidasa positiva se muestra por la aparición de un color azul oscuro dentro de los 30 segundos, esto no se observó para las bacterias coliformes ya que son oxidasas negativas.

### 3.3. Análisis de los parámetros de validación según la ISO 16140-4

#### 3.3.1. Estudio de productividad

Se realizó según la ISO 11133-3, en el cual se utilizaron las cepas *Escherichia coli* WDCM 00013 y *Citrobacter freundii* WDCM 00006, en una cantidad de 50 UFC por placa con cinco réplicas de cada cepa bacteriana en el medio de cultivo CCA y TSA para garantizar la precisión necesaria para este estudio.

##### a. Materiales y reactivos

Se utilizaron placas de Petri, *Escherichia coli* WDCM 00013, *Citrobacter freundii* WDCM 00006, micropipeta, puntas estériles, incubadora, medio de cultivo CCA y TSA.

### **b. Procedimiento**

- Se tomó 1 mL del inóculo de las cepas de *E. coli* y *Citrobacter freundii*, se llevó a diluciones seriadas en caldo Soya Tripticasa para tener una concentración de 50 UFC/mL respectivamente.
- Luego se transfirió 1 mL a las placas Petri, realizando 5 réplicas por cada cepa bacteriana y medio de cultivo, siendo un total de 10 placas por cepa.
- Después se vertió el medio de cultivo CCA y TSA en las placas Petri, se homogeneizó y fueron llevados a incubación a 37 °C por 24 h aproximadamente.
- Pasadas las 24 h de incubación se verificó el crecimiento microbiano en cada medio de cultivo para su posterior cuantificación.

#### **3.3.2. Precisión interna**

- Se seleccionó una muestra, en este caso el queso serranito ya que artificialmente contaminado fue estable desde el punto de vista microbiológico.
- Se realizaron las pruebas de manera aleatoria en ocho días diferentes por dos analistas, correspondiendo cuatro días por analista.
- Se realizaron pruebas en cinco réplicas utilizando el método alternativo (CCA), lo que da un total de  $8 \times 5 = 40$  pruebas.
- Además, se realizaron cinco réplicas de repetición utilizando el método de referencia (VRBL y TBX) el primer día como control, lo que da un total de  $5 \times 2 = 10$  pruebas.

#### **3.3.3. Perfil de precisión**

- Se seleccionaron seis muestras, que fueron el queso fresco, lluta, mantecoso, mozzarella, ricotta y serranito, que fueron contaminados artificialmente para que fueran estables microbiológicamente.
- Se clasificaron las muestras en tres niveles de contaminación: baja, intermedia y alta (dos muestras por cada una); estas cubrieron toda la gama de contaminación de los productos seleccionados.

- Se realizaron las pruebas de manera aleatoria en seis días diferentes.
- Se realizaron las pruebas en cinco réplicas utilizando el método alternativo (CCA) y el método de referencia (VRBL y TBX), lo que da un total de  $3 \times 5 \times 6 = 90$  pruebas.

#### 3.3.4. Estudio de veracidad relativa

- Se seleccionaron cinco muestras, que fueron el queso fresco, lluta, mozzarella, mantecoso y serranito, que fueron artificialmente contaminadas, ya que no fue posible adquirir un número suficiente de muestras contaminadas naturalmente.
- Se realizaron las pruebas de manera aleatoria en cinco días diferentes.
- Se realizaron las pruebas en cinco réplicas utilizando el método alternativo (CCA) y el método de referencia (VRBL y TBX), lo que da un total de  $3 \times 5 \times 5 = 75$  pruebas.

#### 3.3.5. Inclusividad

- Se realizó cada prueba solo una vez con el método alternativo (CCA), los métodos de referencia (VRBL y TBX) y un agar no selectivo (TSA).
- Se utilizaron las cepas *Escherichia coli* WDCM 00013 y *Citrobacter freundii* WDCM 00006.
- El nivel de inóculo fue de 100 UFC/mL para la cuantificación del método alternativo (CCA) que se está validando.

#### 3.3.6. Exclusividad

- Se realizó cada prueba solo una vez con el método alternativo (CCA) y los métodos de referencia (VRBL y TBX).
- Se utilizaron las cepas *Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00025, *Salmonella enterica* WDCM 00030, *Staphylococcus aureus* WDCM 00034 y *Staphylococcus saprophyticus* WDCM 00159, *Enterococcus faecalis* WDCM 00087.
- El nivel de inóculo fue de 100 UFC/mL para la cuantificación del método alternativo (CCA) que se está validando.

### 3.3.7. Análisis estadístico de los resultados de los métodos de referencia (VRBL y TBX) y alternativo (CCA)

- Se analizó la norma ISO 16140-4 ya que contiene las especificaciones para la validación de métodos alternativos frente a un método de referencia, dentro de esta norma se indicaron herramientas para realizar los cálculos necesarios para cada parámetro de validación.
- Se emplearon formatos de Excel provistos por la norma ISO 16140-4 para el cálculo estadístico de la validación.

### 3.4. Protocolo de análisis de coliformes totales y *E. coli* para quesos no madurados

- Se elaboró un protocolo en base a la ISO 10013 “Sistema de gestión de la calidad” que consistió en el procedimiento para la enumeración de coliformes totales y *E. coli* en muestras de quesos no madurados que se encuentran en un rango de 10 - 150 UFC/g.
- El protocolo contiene objetivo, campo de aplicación, principio del método, materiales y equipos, procedimiento, expresión de resultados y bibliografía.



## **CAPÍTULO III: RESULTADOS**

## PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

### 1. OBTENCIÓN DE MUESTRA

Se obtuvo un total de 18 quesos no madurados del mercado San Camilo en la ciudad de Arequipa a las 9 am el día 19 de Junio del 2023, de 3 establecimientos que expenden los 6 tipos de quesos (fresco, lluta, mantecoso, mozzarella, ricotta y serranito). Posteriormente, se colocaron en bolsas estériles debidamente rotuladas para ser transportadas al LECC y se almacenaron a 4 °C para su conservación antes del análisis, por lo tanto, se realizó un tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia.

### 2. RECUENTO DE COLONIAS EN PLACA DE COLIFORMES TOTALES Y *E. coli* EN LOS MÉTODOS DE REFERENCIA (VRBL y TBX) Y ALTERNATIVO (CCA)

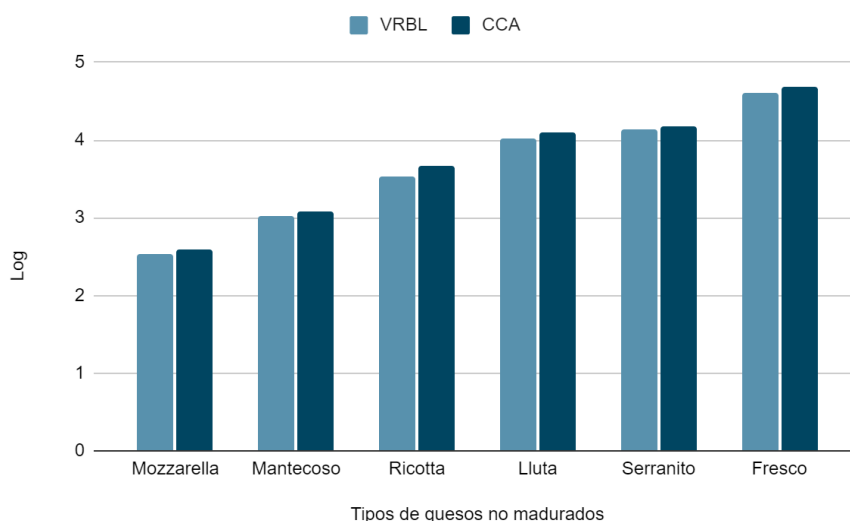
Todos los conteos en placa (UFC/g) realizados, fueron convertidos a logaritmo para un mejor manejo de datos estadísticamente.

**Tabla N° 9**

Rango natural de contaminación de las 6 muestras de quesos no madurados (fresco, lluta, mantecoso, mozzarella, ricotta y serranito) en el medio VRBL frente al CCA

Tipo de Queso	VRBL Log	Promedio	DS	CV %	CCA Log	Promedio	DS	CV %
<b>Fresco</b>	4,5185	4,5983	0,07	1,54	4,5798	4,6864	0,10	2,03
	4,6232				4,7634			
	4,6532				4,7160			
<b>Lluta</b>	4,3222	4,0196	0,26	6,56	4,4472	4,1033	0,30	7,28
	3,8976				3,9542			
	3,8388				3,9085			
<b>Serranito</b>	4,0253	4,1312	0,10	2,43	4,1430	4,1761	0,05	1,19
	4,1430				4,1523			
	4,2253				4,2330			
<b>Mozzarella</b>	2,5682	2,5239	0,07	2,64	2,5798	2,5971	0,04	1,56
	2,4472				2,5682			
	2,5563				2,6435			
<b>Ricotta</b>	3,6532	3,5244	0,12	3,41	3,7324	3,6712	0,07	1,98
	3,5051				3,6902			
	3,4150				3,5911			
<b>Mantecoso</b>	3,1271	3,0244	0,14	4,67	3,1703	3,0884	0,09	2,93
	2,8633				2,9912			
	3,0828				3,1038			

**Gráfico N° 1** Rango natural de contaminación de las 6 muestras de quesos no madurados (fresco, lluta, mantecoso, mozzarella, ricotta y serranito) en el medio VRBL frente al CCA



Los resultados obtenidos en el medio de referencia VRBL muestran el rango de contaminación natural presente de coliformes totales en los quesos no madurados seleccionados para el estudio, se observa que el queso fresco tiene mayor recuento de coliformes totales, seguido de serranito, lluta, ricotta, mantecoso y mozzarella respectivamente. En el análisis estadístico de los métodos, se obtuvo un valor F de 3,1437 que es menor al valor F crítico (4,2597), por lo tanto, se acepta la hipótesis nula que significa que no hay diferencia significativa entre el método alternativo y el de referencia con un 95 % de nivel de confianza.

**Tabla N° 10**

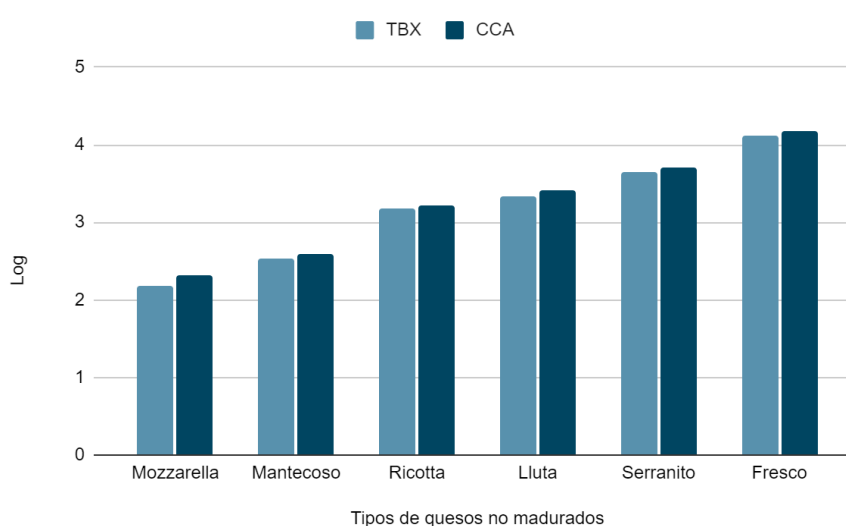
Rango natural de contaminación de las 6 muestras de quesos no madurados (fresco, lluta, mantecoso, mozzarella, ricotta y serranito) en el medio TBX frente al CCA

Tipo de Queso	TBX Log	Promedio	DS	CV %	CCA Log	Promedio	DS	CV %
<b>Fresco</b>	4,2304	4,1103	0,10	2,54	4,2553	4,1702	0,09	2,11
	4,0414				4,0792			
	4,0592				4,1761			
<b>Lluta</b>	3,4472	3,3438	0,23	6,91	3,4624	3,4192	0,20	5,76
	3,5051				3,5911			
	3,0792				3,2041			
<b>Serranito</b>	3,6721	3,6520	0,15	4,15	3,7559	3,7154	0,11	2,96
	3,4914				3,5911			
	3,7924				3,7993			

<b>Mozzarella</b>	2,1139	2,1724	0,17	7,73	2,2788	2,3188	0,11	4,91
	2,3617				2,4472			
	2,0414				2,2304			
<b>Ricotta</b>	3,2041	3,1713	0,08	2,55	3,2041	3,2118	0,04	1,25
	3,2304				3,2553			
	3,0792				3,1761			
<b>Mantecoso</b>	2,5798	2,5323	0,10	4,04	2,6335	2,5847	0,09	3,61
	2,4150				2,4771			
	2,6021				2,6435			

**Gráfico N° 2**

Rango natural de contaminación de las 6 muestras de quesos no madurados (fresco, lluta, mantecoso, mozzarella, ricotta y serranito) en el medio TBX frente al CCA



Este gráfico muestra de forma creciente el nivel de contaminación natural de *E. coli* presente en los diferentes tipos de muestra en ambos medios de cultivo, de esta manera se puede agrupar en tres niveles de contaminación, el nivel más alto lo presentan el queso fresco y serranito, seguido de un nivel intermedio donde se encuentran el lluta y ricotta, y el nivel bajo que está constituido por el mantecoso y mozzarella. El análisis estadístico para los métodos realizados dio como resultado un valor F de 2,6862 el cual es menor al valor de F crítico (4,2597), esto indica que se acepta la hipótesis nula por lo tanto no hay diferencia significativa entre la varianza del método alternativo y de referencia con un 95 % de nivel de confianza.

### 3. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ALTERNATIVO

#### 3.1. ESTUDIO DE PRODUCTIVIDAD

**Tabla N° 11**

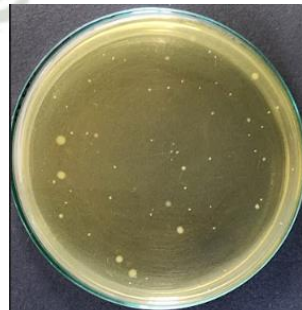
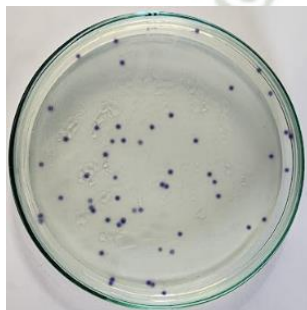
Estudio de productividad del método alternativo (CCA) frente a un agar no selectivo (TSA) para *E. coli* y *C. freundii*

Cepa	N° placa	Recuento de colonias CCA	Recuento de colonias TSA	Recuperación relativa %
<i>E. coli</i>	1	60	60	96
	2	60	58	
	3	55	63	
	4	58	60	
	5	59	63	
	Suma	292	304	
<i>C. Freundii</i>	1	74	56	106
	2	60	59	
	3	74	71	
	4	65	65	
	5	67	69	
	Suma	340	320	
<b>Recuperación relativa media para bacterias coliformes</b>				101

Se obtuvo una recuperación relativa de 96 % para *E. coli* y para los coliformes totales fue de 101 % en el medio de estudio CCA.

**Gráfico N° 3**

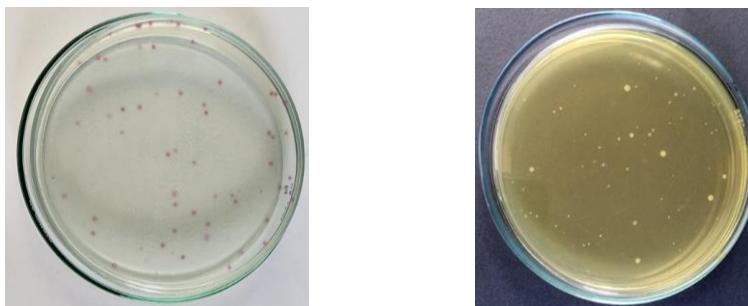
Recuento de *E. coli* en concentración 50 UFC/mL en CCA y TSA



**Fuente:** Autor

### Gráfico N° 4

Recuento de *C. freundii* en concentración 50 UFC/mL en CCA y TSA



Fuente: Autor

### 3.2. PRECISIÓN INTERNA

Tabla N° 12

Recuentos obtenidos a partir de los inóculos de *E. coli* y coliformes totales (*C. freundii* y *E. coli*) para el estudio de precisión del método alternativo (CCA) bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad del LECC (Analista Y)

Día	Placa	<i>E. coli</i> Log	<i>C. freundii</i> Log	Coliformes totales	Suma de cuadrados (Yij- Yj)
1	1	4,63849	4,63849	4,93952	0,000679
	2	4,59660	4,51851	4,86034	0,000251
	3	4,59660	4,64836	4,92428	0,000251
	4	4,62839	4,60206	4,91645	0,000255
	5	4,60206	4,64836	4,92686	0,000107
	<b>Promedio</b>	<b>4,61243</b>	<b>4,61116</b>	<b>4,91349</b>	
2	1	4,69897	4,44716	4,89209	0,000210
	2	4,66276	4,41497	4,85733	0,000472
	3	4,69897	4,39794	4,87506	0,000210
	4	4,66276	4,51188	4,89487	0,000472
	5	4,69897	4,38021	4,86923	0,000210
	<b>Promedio</b>	<b>4,68449</b>	<b>4,43043</b>	<b>4,87772</b>	
3	1	4,32222	4,41497	4,67210	0,000109
	2	4,26717	4,29003	4,57978	0,001988
	3	4,33244	4,30103	4,61805	0,000427
	4	4,23045	4,23045	4,53148	0,006612
	5	4,40654	4,25527	4,63849	0,008983
	<b>Promedio</b>	<b>4,31176</b>	<b>4,29835</b>	<b>4,60798</b>	
4	1	4,64345	4,49136	4,87506	0,000359
	2	4,66276	4,53148	4,90309	0,001462
	3	4,62325	4,61278	4,91908	0,000002
	4	4,60206	4,41497	4,81954	0,000504
	5	4,59106	4,56820	4,88081	0,001119
	<b>Promedio</b>	<b>4,62452</b>	<b>4,52376</b>	<b>4,87952</b>	
<b>Suma analista Y</b>			<b>0,02468</b>		

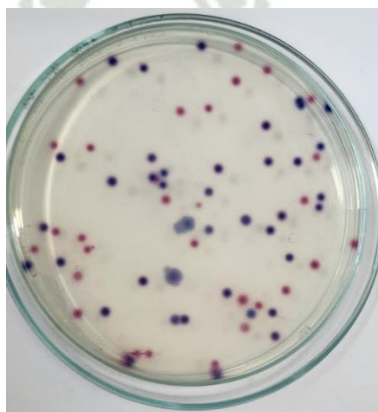
**Tabla N° 13**

Recuentos obtenidos a partir de los inóculos de *E. coli* y *coliformes totales* (*C. freundii* y *E. coli*) para el estudio de precisión del método alternativo (CCA) bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad del LECC (Analista M)

Día	Placa	<i>E. coli</i> Log	<i>C. freundii</i> Log	Coliformes totales	Suma de cuadrados (Yij- Yj)
1	1	4,48430	4,72835	4,92428	0,01453
	2	4,58546	4,85733	5,04336	0,00037
	3	4,72428	4,78888	5,05881	0,01427
	4	4,63347	4,62325	4,92942	0,00082
	5	4,59660	4,72428	4,96614	0,00007
	<b>Promedio</b>	<b>4,60482</b>	<b>4,74442</b>	<b>4,98440</b>	
2	1	4,61278	4,27875	4,77815	0,005296
	2	4,75587	4,33244	4,89487	0,004944
	3	4,72428	4,51851	4,93450	0,001499
	4	4,67210	4,25527	4,81291	0,000181
	5	4,66276	4,29003	4,81624	0,000520
	<b>Promedio</b>	<b>4,68556</b>	<b>4,33500</b>	<b>4,84733</b>	
3	1	4,26717	4,52504	4,71600	0,000054
	2	4,26717	4,29003	4,57978	0,000054
	3	4,37107	4,29003	4,63347	0,012381
	4	4,17609	4,27875	4,53148	0,007007
	5	4,21748	4,26717	4,54407	0,001790
	<b>Promedio</b>	<b>4,25980</b>	<b>4,33021</b>	<b>4,60096</b>	
4	1	4,62839	4,49136	4,86629	0,000001
	2	4,66276	4,53148	4,90309	0,001234
	3	4,64836	4,61278	4,93197	0,000430
	4	4,60206	4,41497	4,81954	0,000654
	5	4,59660	4,56820	4,88366	0,000963
	<b>Promedio</b>	<b>4,62763</b>	<b>4,52376</b>	<b>4,88091</b>	
<b>Suma analista M</b>		<b>0,06707</b>			

**Gráfico N° 5**

Recuento de *E. coli* y *C. freundii* en concentración 30 UFC/mL en CCA



**Fuente:** Autor

**Tabla N° 14**

Estudio de precisión interna del método alternativo (CCA) bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad interna del *LECC* para *E. coli*

Parámetro	Desviación Estándar	Coefficiente de variación %
<b>Sr</b>	0,00287	0,0630
<b>SI</b>	0,17401	3,8233

\* Sr: Desviación estándar de repetibilidad SI: Desviación estándar de reproducibilidad

**Tabla N° 15**

Estudio de precisión interna del método alternativo (CCA) bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad interna del LECC para coliformes totales

Parámetro	Desviación Estándar	Coefficiente de variación %
<b>Sr</b>	0,00266	0,0551
<b>SI</b>	0,14870	3,0824

\* Sr: Desviación estándar de repetibilidad SI: Desviación estándar de reproducibilidad

La fórmula aplicada en este parámetro está dada por la ISO 16140 - 2, para el cálculo de la desviación estándar se considera el número de días que fue 8 y el número de replicados que fue 5 y la suma de diferencias de los analistas.

### 3.3. ESTUDIO DE VERACIDAD RELATIVA

**Tabla N° 16**

Estudio de veracidad relativa del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (VRBL) para coliformes totales

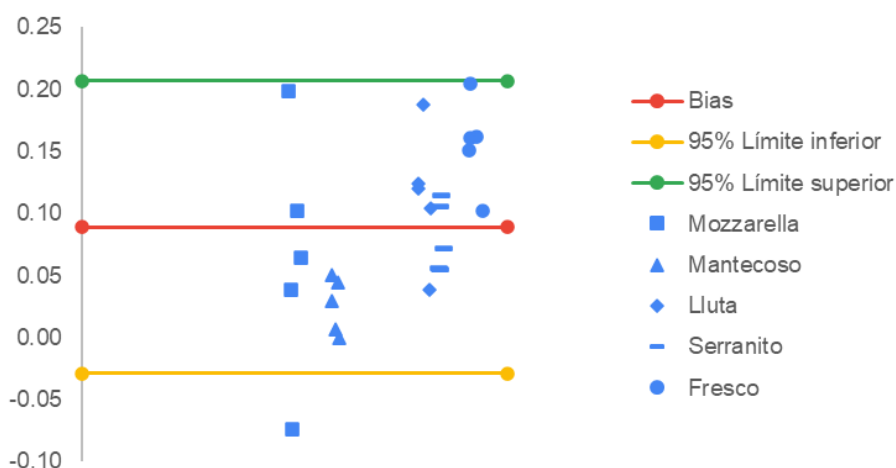
Muestra	Método de referencia (VRBL)	Método alternativo (CCA)	Promedio	Diferencia	
<b>1</b>	<b>Mozzarella</b>	2,53782	2,60206	2,56994	0,06424
		2,47712	2,57978	2,52845	0,10266
		2,33244	2,53148	2,43196	0,19904
		2,43136	2,46982	2,45059	0,03846
		2,50515	2,43136	2,46826	-0,07379
<b>2</b>	<b>Mantecoso</b>	2,90580	2,95665	2,93123	0,05085
		2,92686	2,95665	2,94176	0,02979
		2,98677	3,03141	3,00909	0,04464
		2,97313	2,98000	2,97657	0,00687

		3,01703	3,01703	3,01703	0,00000
3	Lluta	4,05881	4,09691	4,07786	0,03810
		3,91908	4,10721	4,01315	0,18813
		4,04922	4,15381	4,10152	0,10459
		3,88649	4,00647	3,94648	0,11998
		3,89487	4,01912	3,95700	0,12425
4	Serranito	4,16732	4,22272	4,19502	0,05540
		4,15836	4,21484	4,18660	0,05648
		4,15685	4,27184	4,21435	0,11499
		4,14613	4,25285	4,19949	0,10672
		4,20817	4,28103	4,24460	0,07286
5	Fresco	4,56229	4,72428	4,64329	0,16199
		4,47712	4,63849	4,55781	0,16137
		4,65321	4,75587	4,70454	0,10266
		4,46240	4,66745	4,56493	0,20505
		4,47712	4,62839	4,55276	0,15127
<b>Promedio</b>					0,08906
<b>Desviación estándar</b>					0,06769

<b>Límite superior</b>	0,20715
<b>Límite inferior</b>	-0,02903

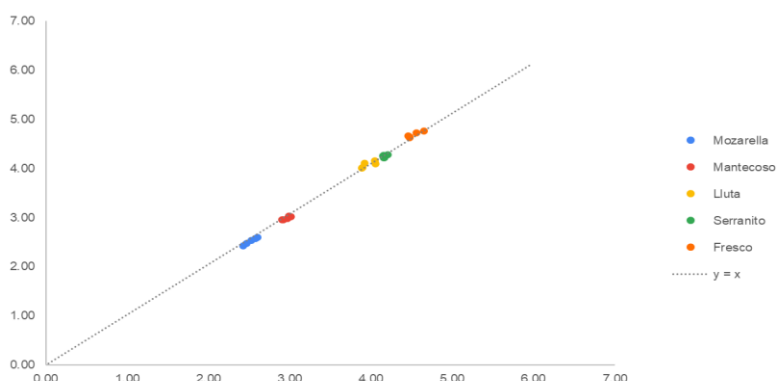
### Gráfico N° 6

Estudio de veracidad relativa del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (VRBL) para coliformes totales interpretados con el método Bland - Altman



**Gráfico N° 7**

Estudio de veracidad relativa del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (VRBL) para coliformes totales interpretados en el gráfico de dispersión



**Tabla N° 17**

Estudio de veracidad relativa del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (TBX) para *E. coli*

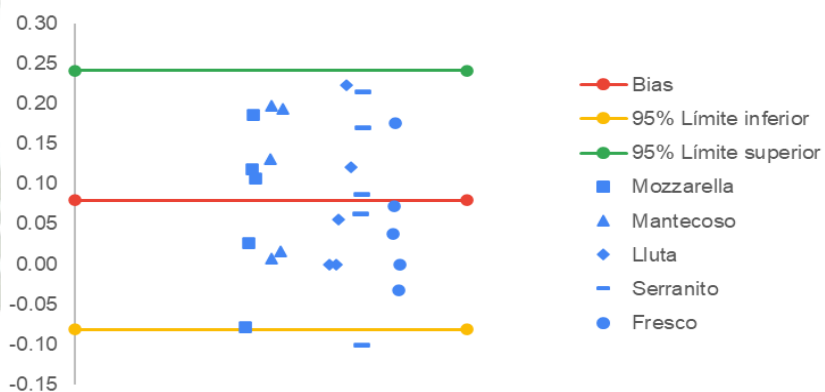
Muestra		Método de referencia (TBX)	Método alternativo (CCA)	Promedio	Diferencia
1	Mozzarella	2,17609	2,36173	2,26891	0,18564
		2,25527	2,36173	2,30850	0,10646
		2,20412	2,32222	2,26317	0,11810
		2,20875	2,13033	2,16954	-0,07842
		2,20412	2,23045	2,21728	0,02633
2	Mantecoso	2,61805	2,63347	2,62576	0,01542
		2,49831	2,50515	2,50173	0,00684
		2,43136	2,56229	2,49683	0,13093
		2,55023	2,74429	2,64726	0,19406
		2,41497	2,61278	2,51388	0,19781
3	Lluta	3,33244	3,33244	3,33244	0,00000
		3,46982	3,59106	3,53044	0,12124
		3,36173	3,58546	3,47359	0,22373
		3,34242	3,39794	3,37018	0,05552
		3,25527	3,25527	3,25527	0,00000
4	Serranito	3,70757	3,60746	3,65751	<b>-0,10012</b>
		3,58546	3,75587	3,67067	0,17041
		3,56229	3,77815	3,67022	0,21586
		3,61278	3,67669	3,64474	0,06391
		3,60746	3,69461	3,65103	0,08715
		4,14613	4,14613	4,14613	0,00000

5	Fresco	4,14613	4,11394	4,13004	-0,03218
		4,04139	4,07918	4,06029	0,03779
		4,00000	4,17609	4,08805	0,17609
		4,04139	4,11394	4,07767	0,07255
<b>Promedio</b>					0,07980
<b>Desviación estándar</b>					0,09253

<b>Límite superior</b>	0,24126
<b>Límite inferior</b>	-0,08165

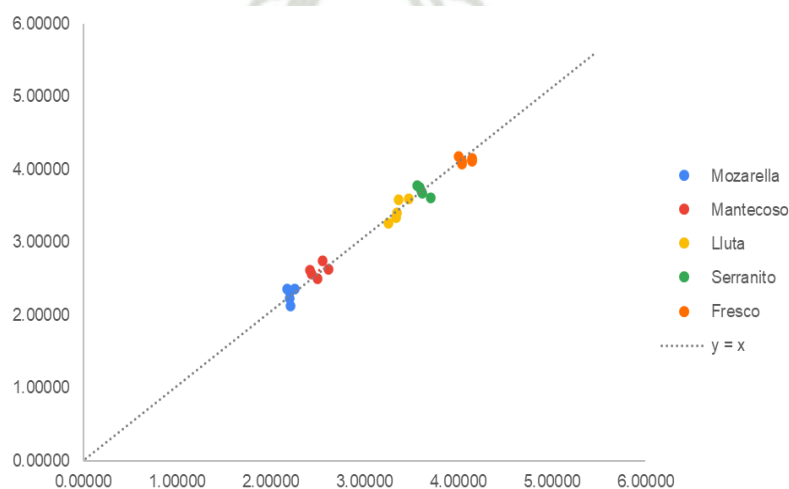
**Gráfico N° 8**

Estudio de veracidad relativa del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (TBX) para *E. coli* interpretados con el método Bland - Altman



**Gráfico N° 9**

Estudio de veracidad relativa del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (TBX) para *E. coli* interpretados en el gráfico de dispersión



Según la ISO 16140-4, la veracidad relativa es un parámetro importante para demostrar la equivalencia al comparar los resultados que obtuvimos entre el método de referencia y el alternativo. Los resultados de las muestras se analizaron mediante un gráfico de dispersión, para la evaluación de *E. coli* (Gráfico N° 6) se visualizó que los resultados en todas las muestras tanto en el método de referencia TBX y en el método alternativo CCA tienen una distribución alrededor de la línea diagonal, lo cual indica que hay concordancia entre los resultados de ambos métodos; de forma similar se apreció en los resultados de coliformes totales (Gráfico N° 4). Adicionalmente, se empleó el método de Bland - Altman en el cual se ilustra el grado de sesgo y la falta de concordancia de los datos obtenidos, además también muestra la línea de identidad, la línea de sesgo y los límites (inferior y superior) del sesgo al 95% de confianza. En el caso de los resultados de coliformes totales, se calculó un límite superior de 0.20715 y un límite inferior de -0.02903 (Tabla N° 19), la mayoría de los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites, excepto un valor de la muestra mozzarella. Para *E. coli*, se obtuvo un valor de límite superior 0.24126 y un límite inferior de -0.08165 (Tabla N° 20), excepto un valor de la muestra serranito.

### 3.4. PERFIL DE PRECISIÓN

Tabla N° 18

Estudio de perfil de precisión del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (VRBL) para coliformes totales

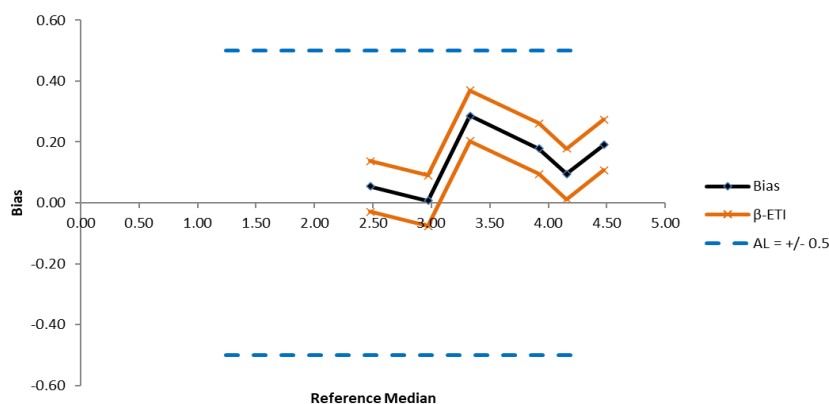
Nombre de la muestra	Valor central Ref VRBL	Valor central Alt CCA	Bias	Upper $\beta$ -ETI	Lower $\beta$ -ETI	Comparación con LA= $\pm$ 0.5	Comparación final
Mozzarella	2,47712	2,53148	0,054	0,137	-0,029	YES	YES
Mantecoso	2,97313	2,98000	0,007	0,090	-0,076	YES	YES
Ricotta	3,33244	3,61805	0,286	0,369	0,202	YES	YES
Lluta	3,91908	4,09691	0,178	0,261	0,095	YES	YES
Serranito	4,15836	4,25285	0,094	0,178	0,011	YES	YES
Fresco	4,47712	4,66745	0,190	0,273	0,107	YES	YES

	Método de referencia	Método alternativo	SD Repetibilidad del método de referencia $\leq$ 0.125	Final LA
SD Repetibilidad	0,084	0,058	YES	+/- 0,5

**Gráfico N° 10**

Estudio de perfil de precisión del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (VRBL) para coliformes totales



**Tabla N° 19**

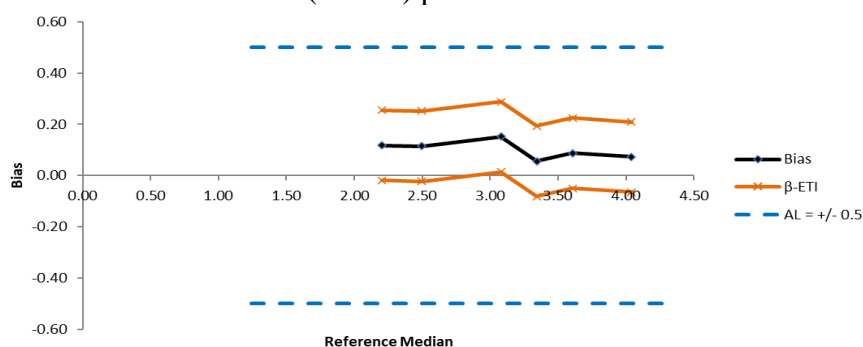
Estudio de perfil de precisión del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (TBX) para *E. coli*

Nombre de la muestra	Valor central Ref TBX	Valor central Alt CCA	Bias	Upper $\beta$ -ETI	Lower $\beta$ -ETI	Comparación con LA= $\pm 0.5$	Comparación final
Mozzarella	2,20412	2,32222	0,118	0,255	-0,019	YES	YES
Mantecoso	2,49831	2,61278	0,114	0,252	-0,023	YES	YES
Ricotta	3,07918	3,23045	0,151	0,289	0,014	YES	YES
Lluta	3,34242	3,39794	0,056	0,193	-0,082	YES	YES
Serranito	3,60746	3,69461	0,087	0,224	-0,050	YES	YES
Fresco	4,04139	4,11394	0,073	0,210	-0,065	YES	YES

	Método de referencia	Método alternativo	SD Repetibilidad del método de referencia $\leq 0.125$	Final LA
SD Repetibilidad	0,076	0,095	YES	+/- 0,5

**Gráfico N° 11**

Estudio de perfil de precisión del método alternativo (CCA) frente al método de referencia (VRBL) para coliformes totales



### 3.5. ESTUDIO DE INCLUSIVIDAD DEL MÉTODO ALTERNATIVO (CCA) FRENTE A LOS MÉTODOS DE REFERENCIA (VRBL Y TBX) Y UN AGAR NO SELECTIVO (TSA)

El medio de cultivo CCA ha sido evaluado y aprobado por el programa AOAC Performance Tested Methods, lo que significa que ha sido probado y que funciona en función a las especificaciones proporcionadas por el fabricante, este documento se visualiza en el Anexo N° 13, donde se describe los estudios de inclusividad evaluados por el Instituto de investigación AOAC.

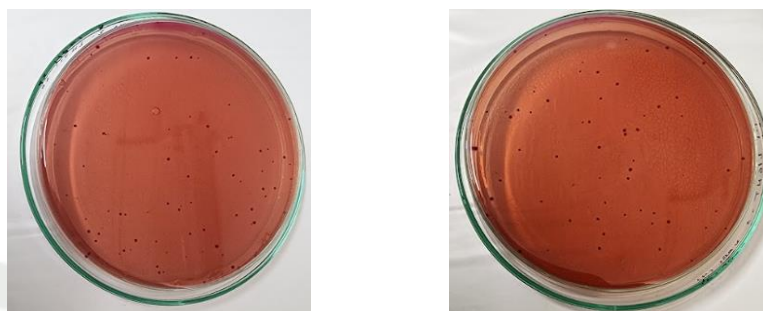
**Tabla N° 20**

Crecimiento y color de colonia de las cepas de coliformes y *E. coli* incubadas en VRBL a 35 °C por 24 h

Microorganismos	Número de origen	Color de colonia	Caldo verde brillante	Conteo UFC/mL	Cantidad inóculo UFC/mL
<i>Citrobacter freundii</i>	WDCM 00006	Rojo	Positivo	82	100
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Rojo	Positivo	61	100

**Gráfico N° 12**

Recuento de *E. coli* y *C. freundii* en concentración 100 UFC/mL en VRBL



**Fuente:** Autor

**Tabla N° 21**

Crecimiento y color de colonia de las cepas de coliformes y *E. coli* incubadas en TBX a 44 °C por 24 h

Microorganismos	Número de origen	Color de colonia	Salmon-GAL B-D-galactosidasa	X-glucuronidasa B-D-glucuronidasa	Conteo UFC/mL	Cantidad inóculo UFC/mL
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Azul	Positivo	Positivo	86	100

**Gráfico N° 13**

Recuento de *E. coli* en concentración 30 UFC/mL en TBX



**Fuente:** Autor

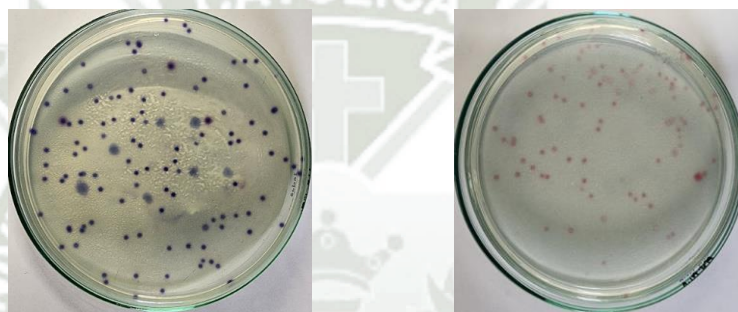
**Tabla N° 22**

Crecimiento y color de colonia de las cepas de coliformes y *E. coli* incubadas en CCA  
a 35 °C por 24 h

Microorganismos	Número de origen	Color de colonia	Salmon-GAL B-D-galactosidasa	X-glucuronidasa B-D-glucuronidasa	Prueba de Oxidasa	Prueba de catalasa	Conteo UFC/mL	Cantidad inóculo UFC/mL
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Azul	Positivo	Positivo	-	-	122	100
<i>Citrobacter freundii</i>	WDCM 00006	Rojo	Positivo	Negativo	-	-	109	100

**Gráfico N° 14**

Recuento de *E. coli* y *C. freundii* en concentración 100 UFC/mL en CCA



**Fuente:** Autor

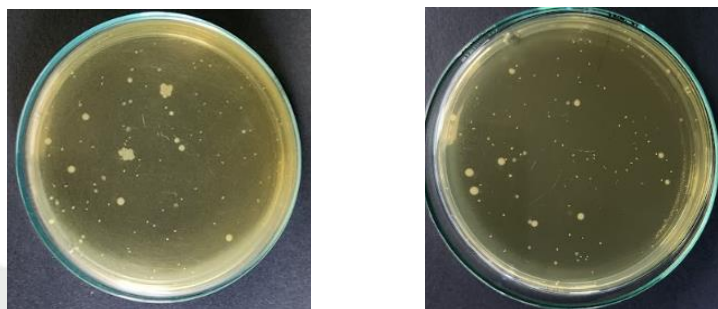
**Tabla N° 23**

Crecimiento y color de colonia de las cepas de coliformes y *E. coli* incubadas en TSA a  
35 °C por 24 h

Microorganismos	Número de origen	Color de colonia	Conteo UFC/mL	Cantidad inóculo UFC/mL
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Beige	134	100 UFC/mL
<i>Citrobacter freundii</i>	WDCM 00006	Beige	127	100 UFC/mL

### Gráfico N° 15

Recuento de *E. coli* y *C. freundii* en concentración 100 UFC/mL en TSA



Fuente: Autor

#### 1.1. ESTUDIO DE EXCLUSIVIDAD DEL MÉTODO ALTERNATIVO (CCA) FRENTE A LOS MÉTODOS DE REFERENCIA (VRBL Y TBX)

El medio de cultivo CCA ha sido evaluado y aprobado por el programa AOAC Performance Tested Methods, lo que significa que ha sido probado y que funciona en función a las especificaciones proporcionadas por el fabricante, este documento se visualiza en el Anexo N° 13, donde se describe los estudios de exclusividad evaluados por el Instituto de investigación AOAC.

Tabla N° 24

Crecimiento y color de colonia de las cepas de *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* y *Salmonella entérica* incubadas en VRBL a 35 °C por 24 h

Microorganismos	Número de origen	Color de colonia
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	Beige
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034	-
<i>Salmonella entérica</i>	WDCM 00030	Blanco
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	WDCM 00159	-

**Tabla N° 25**

Crecimiento y color de colonia de las cepas de *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* y *Salmonella entérica* incubadas en TBX a 44 °C por 24 h

Microorganismos	Número de origen	Color de colonia	Salmon-GAL B-D-galactosidasa	X-glucoronidasa B-D-glucuronidasa
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034	-	-	-
<i>Salmonella entérica</i>	WDCM 00030	-	-	-
<i>Staphylococcus Saprophyticus</i>	WDCM 00159	-	-	-

**Tabla N° 26**

Crecimiento y color de colonia de las cepas de *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* y *Salmonella entérica* incubadas en CCA a 35 °C por 24 h

Microorganismos	Número de origen	Color de colonia	Salmon-GAL B-D-galactosidasa	X-glucoronidasa B-D-glucuronidasa
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Blanco	Negativo	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	Sin color	Negativo	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034	-	-	-
<i>Salmonella entérica</i>	WDCM 00030	Sin color	Negativo	Negativo
<i>Staphylococcus Saprophyticus</i>	WDCM 00159	-	-	-

## 2. PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE COLIFORMES TOTALES Y *E. coli* PARA QUESOS NO MADURADOS

	<b>UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD</b>			
	<b>SELECCIÓN, VERIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS</b>			
Código	Edición N° 01	Fecha de Aprobación	Aprobado por	Página 1 de 2

**MÉTODO DE ENSAYO MICROBIOLÓGICO Ed. 01 RECuento EN PLACA DE COLIFORMES TOTALES Y *Escherichia coli* UTILIZANDO EL MEDIO DE CULTIVO COMERCIAL CROMOGENICO CCA (AGAR PARA COLIFORMES CHROMOCULT) EN QUESOS NO MADURADOS**

**A. Fundamento**

El medio de cultivo Agar para Coliformes Chromocult, es empleado en el análisis microbiológico de quesos no madurados. Este medio proporciona la detección, diferenciación y recuento simultáneo de coliformes totales y *E. coli* en un tiempo de 24 horas a una temperatura de 36°C. La cuantificación de coliformes se basa en la capacidad de la enzima B-D-galactosidasa para escindir el sustrato Salmon-GAL dando como resultado colonias de color rojo salmon. Para el recuento de *E. coli* se basa en la capacidad de sus enzima B-D-glucuronidasa y B-D-galactosidasa de escindir los sustratos X-glucurónido y Salmon-GAL respectivamente, produciendo colonias de color de azul oscuro a violeta.

**B. Materiales**

- Tubos de Durham.
- Tubos de ensayo 16 mm x 160 mm.
- Botellas o matraces para ebullición de medios de cultivo.
- Placas de Petri, de diámetro 90 mm a 100 mm.
- Asa de platino-iridio o níquel-plomo, de 3 mm de diámetro aprox. o asas desechables.
- Puntas estériles.
- Portaobjetos.
- Tubos de ensayos con tapa estériles y del mismo volumen.
- Mechero Bunsen.
- Gradillas.
- Espátulas.

***Toda copia en PAPEL es un "Documento no Controlado" a excepción del original***

- Cucharas para recoger la muestra.
- Bolsas estériles.
- Vasos precipitados.
- Guantes de nitrilo.
- Jeringas estériles descartables.
- Filtros descartables de 0.45  $\mu$ m.
- Algodón.
- Gasas.

#### C. Materiales biológicos

- *Escherichia coli* WDCM 00013.
- *Enterococcus faecalis* WDCM 00087.

#### D. Método de trabajo

- Pesar 10 g de muestra de queso no madurado de la parte interna del medio en un recipiente estéril con una balanza analítica.
- Agregar 90 mL del diluyente de peptona tamponado con 0.4 mL de Tween 80 para conseguir una muestra homogénea.
- Llevar el recipiente al Stomacher durante 30 segundos a una revolución de 4000 rpm.
- Colocar todo el contenido en un frasco con rosca proveniente del diluyente.
- Transferir 1 mL del frasco con rosca a un tubo con 9 mL de diluyente de peptona tamponado para realizar las diluciones correspondientes para el queso no madurado.
- Inocular a una placa Petri estéril 1 ml de la dilución correspondiente y por duplicado.
- Vertir en cada placa petri aproximadamente 15 ml del medio CCA, previamente atemperada a 44 °C - 47 °C.
- Mezclar con cuidado el inóculo con el medio y dejar solidificar en las placas Petri sobre una superficie horizontal fría.
- Invertir los platos inoculados en una incubadora a 36 °C +/- 2 °C durante un periodo de 21 h +/- 3 h.
- Usar el equipo de recuento de colonias para identificar las colonias típicas de coliformes con reacción positiva de  $\beta$ -D-galactosidasa (rosado a rojo) y también las que presentan reacción positiva de  $\beta$ -D-galactosidasa y  $\beta$ -D-glucuronidasa (azul oscuro a violeta) como *E. coli*.
- Confirmar la presunción de bacterias coliformes que no son *E. coli* usando una prueba de oxidasa.

**Toda copia en PAPEL es un "Documento no Controlado" a excepción del original**

**E. Aseguramiento de la calidad**

Realizar dos ensayos paralelos al de la muestra, empleando las cepas de referencia como controles positivos para verificar la capacidad productiva del medio y prevenir falsos negativos, también un control negativo o blanco para verificar que las condiciones de ensayo son correctas libres de contaminación.

**F. Expresión de resultados:**

Calcular el número de UFC de *E. coli* y coliformes totales presente en la muestra de queso no madurado por gramo.

\_\_\_\_\_  
DIRECTOR TÉCNICO

\_\_\_\_\_  
ESPECIALISTA DEL  
LABORATORIO

\_\_\_\_\_  
SADC

*Toda copia en PAPEL es un "Documento no Controlado" a excepción del original*

## DISCUSIONES

La obtención de la muestra es muy importante en este proceso de validación, ya que la diversa cantidad de factores de contaminación externa al proceso de producción de los quesos no madurados es de relevancia para determinar si el producto es apto para el consumo humano, y por lo tanto influencia en el recuento de coliformes totales y *E. coli*. En este proceso de recolección de muestra, se pudo observar la deficiencia de higiene en la manipulación.

Un proceso importante en la validación es analizar las muestras de estudio siguiendo el proceso estándar establecido por el laboratorio, de esta manera se pudo recolectar información sobre la carga microbiana natural de las muestras que fueron empleadas para el presente estudio y también para determinar los niveles de contaminación necesarios para la evaluación del método alternativo. Se confirmó la presencia de coliformes totales y *E. coli* en las muestras (mozzarella, mantecoso, ricotta, serranito, lluta y fresco) que fueron recolectadas del mercado San Camilo de la ciudad de Arequipa, además se evidenció una alta contaminación de estos microorganismos en comparación con lo establecido por la R.M. N° 591 que rige la calidad de los alimentos donde especifica que el límite permitido para coliformes totales es 1000 UFC/g y para *E. coli* es 10 UFC/g en quesos, incumpliendo en un 78 % de las muestras para el recuento de coliformes totales. Esto concuerda con otras investigaciones realizadas por I. Palpa Chávez (2015) (3) y, Y. Ccasso Chua y F. Huallpa Mamani (2020) (57), realizadas en nuestro territorio nacional. Los resultados estadísticos entre el método de referencia y alternativo indicaron que no hay diferencia significativa (Tabla N° 9 y 10), ya que el medio CCA muestra compatibilidad para los microorganismos objetivos presentes en la muestra de estudio. Se puede observar que dentro de los quesos no madurados el tipo de queso fresco presenta una alta contaminación que podría estar relacionada a la falta o deficiente esterilización de la materia prima, otra posible causa es por el inadecuado manejo en el proceso de almacenamiento, manipulación y dispensación de las muestras.

Adicionalmente a los resultados obtenidos, se evaluó estadísticamente mediante una prueba de ANOVA, en el caso del medio de referencia (VRBL) se obtuvo un valor F de 3,1437 que

es menor al F crítico con un valor de 4,2597, de la misma forma se evidencio en el medio de referencia (TBX) donde se obtuvo un valor F de 2,6862 el cual es menor al valor de F crítico (4,2597), esto indica que se acepta la hipótesis nula en ambos casos, por lo tanto no hay diferencia significativa entre la varianza del método alternativo (CCA) y de referencia (TBX y VRBL) con un 95 % de nivel de confianza. Así mismo, es primordial destacar las ventajas de emplear el medio CCA en comparación al TBX y VRBL, debido a que su costo es menor (aproximadamente 253,57 \$), también se reduce el tiempo de análisis, se emplea menor cantidad de recursos y facilita el trabajo para los analistas.

Dado que validar implica demostrar con un alto nivel de confianza, respaldado por investigaciones documentadas, que un proceso específico producirá consistentemente datos que cumplirán con las características de calidad establecidas, por tal motivo, se especificaron los parámetros que influyen en esta validación. Este proceso implicó el análisis exhaustivo de datos para confirmar su eficacia y la obtención de resultados confiables. Para esto, se evaluaron parámetros cuantitativos de validación como la precisión interna, la veracidad relativa, el perfil de precisión, así mismo también se evaluaron parámetros cualitativos como el análisis de inclusividad y exclusividad.

La seguridad y la capacidad del medio de cultivo de estudio para promover el crecimiento de los microorganismos son esenciales para obtener resultados confiables en la validación. Por lo tanto, el estudio de productividad nos indica que el medio de cultivo CCA posee los nutrientes esenciales para el desarrollo de *E. coli* y coliformes totales. Esto se confirmó al lograr una recuperación del 96 % y 101 % para *E. coli* y coliformes totales respectivamente (Tabla N° 11) en el medio de estudio CCA en comparación con el agar no selectivo TSA, este resultado fue óptimo ya que cumplen con los datos estándar establecidos por la ISO 11133-3, los cuales deben ser  $\geq 50$  %. Así mismo, cumple con el 70 % de recuperación que está establecido por el mismo medio de cultivo para la matriz agua que está descrito en la ISO 9308. Los resultados obtenidos en el estudio de productividad concuerdan con los datos de referencia, por lo tanto, nos confirma que el medio de cultivo CCA tiene la capacidad para el crecimiento de los microorganismos objetivos presentes en la validación.

Se evaluó en la presente investigación la precisión interna que nos proporciona información sobre la repetibilidad que mide la variación de una medición por un mismo analista en las

mismas condiciones y la reproducibilidad que mide el desempeño de diferentes analistas bajo diferentes condiciones; estos resultados son solo válidos para el laboratorio que conduce el estudio. En función al parámetro de repetibilidad, el estudio se realizó con dos analistas para evaluar el recuento de *E. coli* y coliformes totales obteniendo un valor  $S_r$  de 0,00287 y 0,00266 respectivamente (Tabla N° 14 y 15), estos resultados son considerados óptimos ya que es  $< 0,1$ , establecido como valor de referencia indicado en la ISO 13843. Así mismo, para el parámetro de reproducibilidad de *E. coli* y coliformes totales, se calculó un valor  $S_l$  de 0.17401 y 0.14870 respectivamente (Tabla N° 14 y 15), estos valores se encuentran dentro del rango aceptable de variabilidad de la medición de una muestra ( $\pm 0,25$  log UFC/g), descritos como referencia en la ISO 16140-4, el cual determina que el método analizado es preciso dentro del LECC.

Según la ISO 16140-4, la veracidad relativa es un parámetro importante para demostrar la equivalencia al comparar los resultados que obtuvimos entre el método de referencia y el alternativo. Los resultados de las muestras se analizaron mediante un gráfico de dispersión, para la evaluación de *E. coli* (Gráfico N° 6) se visualizó que los resultados en todas las muestras tanto en el método de referencia TBX y en el método alternativo CCA tienen una distribución alrededor de la línea diagonal, lo cual indica que hay concordancia entre los resultados de ambos métodos; de forma similar se apreció en los resultados de coliformes totales (Gráfico N° 4). Adicionalmente, se empleó el método de Bland - Altman en el cual se ilustra el grado de sesgo y la falta de concordancia de los datos obtenidos, además también muestra la línea de identidad, la línea de sesgo y los límites (inferior y superior) del sesgo al 95% de confianza. En el caso de los resultados de coliformes totales, se calculó un límite superior de 0.20715 y un límite inferior de -0.02903 (Tabla N° 16), la mayoría de los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites, excepto un valor de la muestra mozzarella. Para *E. coli*, se obtuvo un valor de límite superior 0.24126 y un límite inferior de -0.08165 (Tabla N° 17), de la misma forma solo un dato se encontró fuera de los límites que corresponde a la muestra serranito. Según se establece en la ISO 16140-4, se espera que no más de uno en veinte valores obtenidos queden fuera de los límites de confianza, de acuerdo con el gráfico obtenido se puede identificar que solo hay un dato fuera del límite de confianza de 25 datos en el análisis para coliformes totales y *E. coli* por lo tanto se cumple con lo requerido en este parámetro. Una posible causa de estos datos atípicos puede ser por

la presencia de una variación inusual en la muestra analizada, en factores como la contaminación externa, una inadecuada homogeneización.

Otro parámetro de relevancia en la validación es el estudio de perfil de precisión que se basa en la comparación entre los resultados calculados entre ambos métodos. Estos datos se representaron gráficamente, en el cual se evidencian los límites de aceptabilidad  $\pm 0,5 \log_{10}$ , el límite superior e inferior de  $\beta$ -ETI ( $\beta$ -expectativa de intervalo de tolerancia), y la desviación estándar de referencia y alternativo. Para el análisis de *E. coli* se obtuvo una desviación estándar de 0,076 para el método de referencia y de 0,095 para el método alternativo (Tabla N° 19), de acuerdo con lo establecido en la ISO 16140-4, estos datos deben ser  $< 0,125$ , por lo tanto, los datos cumplen con este requisito. De la misma forma se concluye para el análisis de coliformes totales, donde se obtuvo una desviación estándar de 0,084 para el método de referencia y de 0,058 para el método alternativo (Tabla N° 18). Para determinar si el método alternativo es aceptado como equivalente al método de referencia para las muestras estudiadas se calcularon los intervalos de tolerancia esperado ( $\beta$ -ETI), los cuales deben cumplir con la condicional de  $U_i \leq AL$  y  $L_i \geq -AL$ , todos los datos obtenidos tanto para *E. coli* (Gráfico N° 7) y coliformes totales (Gráfico N° 8) satisfacen esta condición, por lo tanto, se acepta como equivalente al método alternativo de este estudio.

Este estudio de validación es una ampliación de alcance de muestra de un método previamente validado, por lo tanto, el estudio de inclusividad y exclusividad no son requeridos, sin embargo, se vio por conveniente utilizar cepas que no se utilizaron en este estudio y cepas ya utilizadas (Anexo N° 13) con el objetivo de ampliar y corroborar la información sobre este método. Dentro del análisis cualitativo, se realizó el parámetro de inclusividad con las cepas *E. coli* WDCM 00013 y *C. freundii* WDCM 00006 con el fin de verificar la diferenciación entre la *E. coli* WDCM 00013 y otros coliformes que podrían presentarse por la naturaleza de la muestra, de acuerdo a la ISO 11133-3 se recomienda como microorganismo de referencia a los mencionados previamente, según la Tabla N° 20, 21, 22 y 23 se confirmó las características macroscópicas y bioquímicas, de la misma manera la actividad enzimática de las cepas. En el parámetro de exclusividad, se utilizó las cepas *E. faecalis* WDCM 00087, *P. aeruginosa* WDCM 00025, *S. aureus* WDCM 00034, *Salmonella entérica* WDCM 00030 y *S. Saprophyticus* WDCM 00159 con el objetivo de comprobar la selectividad del método alternativo, se seleccionaron las cepas en base a la

ISO 11133-3 y a la flora microbiana natural que puede estar presente como interferentes en la muestra, al realizar el ensayo se identificó el crecimiento de las cepas *E. faecalis* WDCM 00087, *P. aeruginosa* WDCM 00025 y *Salmonella entérica* WDCM 00030 (Tabla N° 24, 25 y 26) presentando un color blanco que se diferencia del color característico de los microorganismo objetivos, según la información de la ficha técnica del medio sugiere que al presentarse el crecimiento de estas bacterias se debe emplear un complemento adicional que consta de vancomicina y cefsulodina al 0.125%, el cual no se encuentra disponible para el presente estudio, entonces se puede afirmar que el método alternativo es selectivo y diferencial para *E. coli* y coliformes totales.

Durante el desarrollo de la validación de la técnica, se realizó un control microbiológico de los ambientes, superficies y analistas, además de un correcto control de la autoclave con el uso de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953. Por lo tanto, se puede afirmar que la presente investigación si cumple con las especificaciones establecidas por el LECC para el desarrollo de la validación (Anexo N° 14-18).

## CONCLUSIONES

- Se recolectaron los quesos no madurados (fresco, lluta, mantecoso, mozzarella, ricotta y serranito) del mercado San Camilo bajo las condiciones de inclusividad del estudio mediante una toma de muestra no probabilística por conveniencia. La obtención se efectuó de acuerdo con la ISO 707, empleando bolsas estériles y un recipiente aséptico para su transporte con una temperatura óptima.
- Se evaluaron los quesos no madurados con el método alternativo (CCA) y referencia (VRBL y TBX), afirmando estadísticamente mediante una prueba de ANOVA que no hay diferencia significativa entre ellos, ya que se obtuvieron valores de F (3,1437 y 2,6862 respectivamente) menores al F crítico (4,2597). Se concluye que la mayoría de las muestras excedieron los límites máximos de contaminación por el ente regulador de inocuidad alimentaria que establece como valor permitido para coliformes totales de 1000 UFC/g y para *E. coli* de 10 UFC/g en quesos, por consiguiente, la mayoría de estos alimentos no se consideran aptos para el consumo humano.
- Se realizó la validación del método para coliformes totales y *Escherichia coli* utilizando el medio de cultivo CCA, en quesos no madurados. Se comprobó que el método alternativo contiene los componentes necesarios para el desarrollo, crecimiento, diferenciación y selectividad de *E. coli* y coliformes totales. Además, se evidencia que ambos métodos son equivalentes en la matriz de quesos no madurados, dado que cumple con los criterios de aceptación establecidos por la normativa internacional, concluyendo que es repetible, reproducible, exacto y preciso según la ISO 16140 - 4.
- Se desarrolló un protocolo de análisis de validación del método para coliformes totales y *Escherichia coli* utilizando el medio de cultivo comercial cromogénico CCA (Agar para Coliformes Chromocult) en quesos no madurados para el LECC (Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad), ya que este método fue evaluado y demuestra que puede ser replicable en el laboratorio brindando datos confiables para los clientes. Además,

se evidencia que este ensayo en el laboratorio resulta ser menos costoso (S/. 35,00) en comparación a los métodos de referencia (S/. 105,00) para los clientes.



## RECOMENDACIONES

- Para próximos estudios de validación del método para coliformes totales y *Escherichia coli*, sería interesante utilizar adicionalmente otras cepas WDCM de interés para la matriz para ver la influencia de estas sobre el medio de cultivo y poder compararlas con las presentes en esta investigación.
- Es importante resaltar que la validación en un solo laboratorio es un análisis de primer paso para la estandarización de un método microbiológico, ya que brinda la información necesaria para continuar con el segundo paso que es la validación interlaboratorio para así poder establecer un método normalizado.
- Sería interesante que, en futuras validaciones con la misma matriz, la recolección de la muestra sea directamente del fabricante para evitar la contaminación cruzada que puede alterar los datos.
- Se recomienda en próximos estudios el uso del complemento selectivo *E. coli* / Coliforme que contiene cefsulodina y vancomicina, para ver la influencia de este aditivo en los resultados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eden R. Enterobacteriaceae, Coliforms and *E. Coli* Classical and Modern Methods for Detection and Enumeration. Encyclopedia of Food Microbiology [Internet]. 2.<sup>a</sup> ed. Ann Arbor: Elsevier; 2014 [citado 8 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300000975>
2. Condo Palomino DM. Determinación de la Calidad Bacteriológica en Quesos Frescos Artesanales que se expenden en el Mercado Andrés Avelino Cáceres en la ciudad de Arequipa [Bióloga]. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa; 2016.
3. Palpa Chávez IA. Evaluación de la presencia de *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal reciente en el Queso Fresco Artesanal expedido en los mercadillos de Huánuco [Médico veterinario]. Universidad Nacional Hermilio Valdizán; 2015.
4. ISO 9308-1. Water quality - Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora. Geneva: International Standards Organization; 2014.
5. R.M. N° 591 Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano. Perú: DIGESA; 2008.
6. ISO 16140-4. Microbiology of the food chain - Method validation - Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory. Geneva: International Standards Organization; 2020.
7. Astuñaupa Flores O. Evaluación de Coliformes en Quesos Frescos Artesanales que se expenden en el distrito de Yauli. [Ingeniero zootecnista]. Universidad Nacional de Huancavelica; 2021.
8. Rodríguez Lares G. Detección de Microorganismos Indicadores de Contaminación Durante el Proceso de Elaboración de Queso Artesanal a partir de Leche sin Pasteurizar, Producido Bajo Buenas Prácticas de Manufactura en la Región de Cobachi, Sonora. [Químico biólogo clínico]. Universidad de Sonora; 2017.

9. MIDAGRI. Salón del Queso Peruano. Gobierno del Perú; 2023.
10. NTP 202-193. Leche y productos lácteos. Queso. Identificación, clasificación y requisitos. INACAL; 2020.
11. NTP 202-195. Leche y productos lácteos. Queso fresco. Requisitos. INACAL; 2020.
12. Rendulich Gallegos JF. Microflora bacteriana presente en conductos infectados de dientes deciduos en el Laboratorio de Microbiología de la UCSM - 2016. [Cirujano dentista]. Universidad Católica de Santa María; 2016.
13. Saucedo León JE. Evaluación de Coliformes en concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) desembarcadas en la bahía de Sechura bajo requisitos sanitarios del Mercado Unión Económica Euroasiática. [Maestro en ingeniería ambiental y seguridad industrial]. Universidad Nacional de Piura; 2023.
14. APHA, AWWA, AEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. Washington, DC; 1998.
15. ICMSF. Microorganisms in Foods I. Their significance and methods of enumeration. 2.<sup>a</sup> ed. London: University of Toronto Press; 2000.
16. Rompré A, Servais P, Baudart J, de-Roubin M-R, Laurent P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods* [Internet]. 2002 [citado 10 septiembre 2022];(1):31–54. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701201003517>
17. Luque Yucra KD, Rodríguez Yanqui J. Características fisicoquímicas asociadas a la calidad microbiológica de los jugos de piña y naranja expendidos en Juliaca, 2023. [Químico farmacéutico]. Universidad Roosevelt; 2023.
18. Sanz López L. Estudio de factores de virulencia en *Escherichia coli*. [Licenciado en nutrición humana y dietética]. Universidad de Valladolid; 2021.
19. Perez Cedillo GE. Sensibilidad de *Escherichia coli* obtenida de urocultivos en pacientes de 11 a 40 años de edad. [Químico farmacéutico]. Universidad Técnica de Machala; 2019.
20. Díaz Lozano RM. Efecto sinérgico de la azitromicina con inhibidor de bomba de flujo

fenilalanina arginina  $\beta$ -naftilamida (PA $\beta$ N) frente a la resistencia de *Enterobacter aerogenes*. [Biólogo]. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2023.

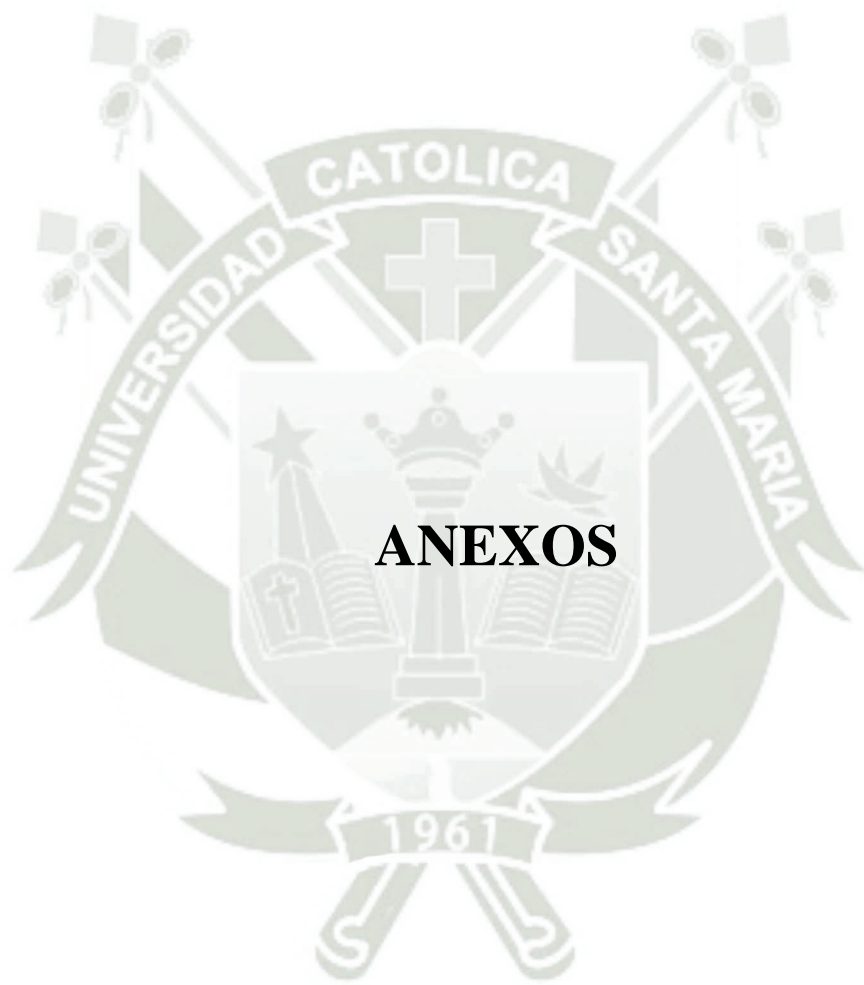
21. Cuellar Y. *Enterobacter aerogenes* [Internet]. Microbiología y Parasitología. 2013. Disponible en: <http://microbiologia2a.blogspot.com/2013/04/enterobacteraerogenes.html>
22. Horacio Lopardo A. Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología [Internet]. 1.<sup>a</sup> ed. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología; 2018. [citado 12 septiembre 2023]. Disponible en: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>
23. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. 25.<sup>a</sup> Ed. México: Mcgraw-Hill Interamericana; 2012.
24. Izquierdo Lázaro L. Biosíntesis del lipopolisacárido de *Klebsiella Pneumoniae*. [Biólogo]. Universidad de Barcelona; 2003.
25. Galarza Sánchez CA. Septicemia por *Citrobacter freundii* en un paciente masculino con enfermedad inflamatoria intestinal. [Internet]. Ocronos. 2023;6(3) 28; 2023. [citado 12 septiembre 2023]. Disponible en: <https://revistamedica.com/septicemia-citrobacter-freundii/#Presentacion-del-caso>
26. Bush L. Manual MSD. Infecciones por *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*. [Internet]. Universidad Florida Atlantic; 2022. [citado 12 septiembre 2023]. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es-pe/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-gramnegativas/infecciones-por-y>
27. CHROMagar. Ficha técnica CHROMagar. [Internet]. [citado 10 septiembre 2023]. Disponible en: [https://www.chromagar.com/es/product/chromagar-serratia/#:~:text=CHROMagar™%20Serratia%20es%20un,\(UCI\)%2C%20especialmente%20neonatal.](https://www.chromagar.com/es/product/chromagar-serratia/#:~:text=CHROMagar™%20Serratia%20es%20un,(UCI)%2C%20especialmente%20neonatal.)
28. Merck millipore. Ficha técnica Agar VRBL (Cristal violeta rojo neutro bilis lactosa). [Internet]. [citado 21 septiembre 2022]. Disponible en: [https://www.merckmillipore.com/PE/es/product/VRB-Violet-Red-Bile-Lactose-agar,MDA\\_CHEM-101406?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F](https://www.merckmillipore.com/PE/es/product/VRB-Violet-Red-Bile-Lactose-agar,MDA_CHEM-101406?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F)

29. Merck millipore. Ficha técnica Agar TBX (Tryptona-Bilis-X-glucurónido). [Internet]. [citado 21 septiembre 2022]. Disponible en: [https://www.merckmillipore.com/PE/es/product/TBX-Tryptone-Bile-X-glucuronide-agar,MDA\\_CHEM-116122](https://www.merckmillipore.com/PE/es/product/TBX-Tryptone-Bile-X-glucuronide-agar,MDA_CHEM-116122)
30. Condalab. Ficha técnica CCA (Agar para Coliformes Chromocult). [Internet]. [citado 12 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.condalab.com/aguas/1314-15203-agar-cromogenico-coliformes-cca-iso.html>
31. Camaró M, Martínez R, Olmos P, Catalá V, Ocete M, Gimeno C. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [Internet]. 2015 [citado 12 septiembre 2022];(7): e31–e36. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-validacion-verificacion-analitica-metodos-microbiologicos-S0213005X13003911>
32. ISO 16140-2. Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Geneva: International Standards Organization; 2016.
33. Beltrán Chipantiza CR. Validación de un método microbiológico para el análisis de coliformes totales y fecales en aguas claras y residuales, para el Centro de Investigaciones y Control Ambiental (CICAM) de la Escuela Politécnica Nacional. [Ingeniero en biotecnología de los recursos naturales]. Universidad Politécnica Salesiana; 2013.
34. Merck millipore. Ficha técnica bioindicador Sterikon® plus [Internet]. Germany. 2012 [citado el 6 de octubre de 2023]. Disponible en: [https://www.merckmillipore.com/PE/es/product/Sterikon-plus-Bioindicator,MDA\\_CHEM-110274#anchor\\_TI](https://www.merckmillipore.com/PE/es/product/Sterikon-plus-Bioindicator,MDA_CHEM-110274#anchor_TI)
35. Dinatale F, Cardozo L, Vera A, Sandoval A. Determinación de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y coliformes en queso Paraguay comercializado en diferentes puntos de venta de las ciudades; José Falcón, Benjamín Aceval y Villa Hayes 2019. *Compend. cienc. vet* [Internet]. 2020 dic [citado 2022 Oct 26]; 10(2): 12-20. Disponible en: [http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2226-17612020000200012&lng=es](http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2226-17612020000200012&lng=es).

36. Merchán N., Zurymar S., Niño L., Urbano E. Determinación de la inocuidad microbiológica de quesos artesanales según las normas técnicas colombianas. Rev. chil. nutr. [Internet]. 2019 jun [citado 26 septiembre 2022; 46(3): 288-294. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75182019000300288&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182019000300288&lng=es).
37. Calampa L, Fernández-Jerí A, Bernal W. Evaluación de la calidad fisicoquímica y microbiológica de queso fresco en las cuencas lecheras de la Región Amazonas, Perú. Agroind. Sci [Internet]. 2019 ene [citado 2022 Sep. 23];8(2):117-21. Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/2241>
38. Métodos y Técnicas de Cuantificación Microbiana Empleados en la Industria de Alimentos, Farmacéutica, Agrícola y Ambiental. Revisión Sistemática de la Literatura [Microbiólogo Industrial]. Pontificia Universidad Javeriana; 2020. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/52072>
39. Ramírez Salinas S. Implementación del sistema de gestión de la calidad para la acreditación en análisis de colimetría para aguas del Laboratorio de Microbiología de la Corporación Universitaria Lasallista basado en la NTC-ISO/IEC 17025:2017 [Magíster en Gestión de la Calidad los Alimentos]. Corporación Universitaria Lasallista; 2021
40. López Aguirre A, Uribe Palacio G. Validación Del Método De Número Más Probable (NMP) para *Staphylococcus aureus* Coagulasa Positiva En Muestras De Leche Cruda como indicador de calidad. [Microbiólogo]. Universidad Libre Seccional Pereira; 2015.
41. Vargas Hoyos Karen, Vidal Arboleda Juana, Olivera-Angel Martha. Validación de método cualitativo para detección de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* en muestras de leche para diagnóstico de mastitis bovina. rev. udcaactual. divulg. cient. [Internet]. 2018 junio [citado 26 septiembre 2022]; 21(1):271-275. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-42262018000100271&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262018000100271&lng=en).
42. Solís Torres A. Confirmación de métodos microbiológicos (Coliformes totales y fecales) en el laboratorio Hygienic Sanitary [Ingeniero en Proceso Bioalimentarios]. Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz; 2017.

43. Quispe Jurado X. Análisis, acreditación y validación en el área de microbiología de alimentos y ambiental en la Empresa Certificaciones y Calidad S.A.C [Biólogo]. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2021.
44. Namigtle Oltehua G. Desarrollo del procedimiento para el análisis microbiológico en base a la NOM 210-SSA1-2014. Apéndice H. (Método aprobado para la estimación de la densidad de coliformes totales, fecales y *E. Coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua) [Ingeniero en Proceso Bioalimentarios]. Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz; 2017.
45. Lange B, Strathmann M, Oßmer R. Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria [Internet]. Letters in Applied Microbiology. 2013 [citado 11 septiembre 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23952651/#:~:text=The%20performance%20of%20chromogenic%20coliform,for%20the%20detection%20of%20E>.
46. Paez Sanabria LJ. Validación secundaria del método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de aguas para consumo humano analizadas en el laboratorio de salud pública del huila [Microbióloga industrial]. Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
47. ISO 16140-1. Microbiology of the food chain - Method validation - Part 1: Vocabulary. Geneva: International Standards Organization; 2016.
48. ISO 19036. Microbiology of the food chain - Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. Geneva: International Standards Organization; 2019.
49. ISO 11133-3. Microbiology of food, animal feed and water - Part 3: Preparation, production, storage and performance testing of culture media. Geneva: International Standards Organization; 2014.
50. Carrillo Zapata EM, Lozano Caicedo AM. Validación del Método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando Agar Chromocult [Microbióloga industrial]. Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
51. ISO 16649. Microbiology of the food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Geneva: International Standards Organization; 2011.

52. ISO 4832. Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal method for the enumeration of coliforms - Colony count technique. Geneva: International Standards Organization; 2006.
53. ISO 13843. Water quality: Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods. Geneva: International Standards Organization; 2017.
54. Curacachi Cárdenas NM. Frecuencia de *Staphylococcus aureus* en quesos de elaboración artesanal, comercializados en Chupaca [Químico farmacéutico]. Universidad Peruana los Andes; 2020.
55. ISO 6887-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. Geneva: International Standards Organization; 2017.
56. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations. Geneva: International Standards Organization; 2008.
57. Ccaso Chua YY, Huallpa Mamani FM. Análisis microbiológico en relación a las condiciones higiénicas sanitarias de expendio de queso frescos comercializados en los mercados de la ciudad de Juliaca [Químico farmacéutico]. Universidad María Auxiliadora; 2020.
58. ISO 707. Milk and milk products. Guidance on sampling. Geneva: International Standards Organization; 2009.



**Anexo N° 1**

**Tabla N° 27**

Costos de los medios de cultivo y pruebas confirmatorias utilizados en la validación

Costos				
Materiales	Método de referencia		Método Alternativo	
	Medios	TBX	\$ 697,28	CCA
VRBL		\$ 214		
Caldo Verde Brillante		\$ 178		
Reactivo oxidasa	-	-	\$ 35,71	
Total	\$ 1,089.28		\$ 835,71	

## Anexo N° 2

### Ficha técnica del medio de cultivo VRBL



#### Violet Red Bile Agar with Lactose (VRBL) ISO

Cat. 1093

Selective medium for the detection and enumeration of coliforms in dairy products, water and food.

#### Practical information

Applications	Categories
Selective enumeration	Coliforms

Industry: Water / Food / Dairy products

Regulations: ISO 11133 / ISO 4832 / BAM



#### Principles and uses

Violet Red Bile Agar with Lactose (VRBL), containing Bile and Violet Red dye, is based on MacConkey Agar (Cat. 1052) for the detection and enumeration of lactose-fermenting bacteria and the differentiation of coliforms or Coliform group from non-lactose fermenting organisms in dairy products, water and foods.

Peptone provides nitrogen, vitamins, minerals and amino acids essential for growth. Yeast extract is a source of vitamins, particularly of the B-group. Lactose is the fermentable carbohydrate providing carbon and energy. Bile salts and crystal violet inhibit Gram-positive bacteria. Neutral red is a pH indicator. Sodium chloride supplies essential electrolytes for transport and osmotic balance. Bacteriological agar is the solidifying agent.

It is convenient to use the pour plate method.

Lactose fermenters form red colonies with red-purple halos. Occasionally the cocci of the intestinal tract can develop as small, punctiform red colonies.

The purplish red colonies with a diameter of at least (sometimes surrounded by a reddish zone of precipitated bile) are considered as typical colonies of coliforms and do not require further confirmation.

Atypical colonies (e.g. of smaller size), and all colonies derived from milk products that contain sugars other than lactose, may result in colonies with an appearance that looks similar to the typical coliforms. These colonies should be confirmed in tubes of Brilliant Green Bile Broth (Cat. 1228).

#### Formula in g/L

Bacteriological agar	15	Bile salts	1.5
Crystal violet	0.002	Neutral red	0.03
Sodium chloride	5	Yeast extract	3
Enzymatic digest of animal tissues	7	Lactose monohydrate	10

#### Preparation

Suspend 41.5 grams of the medium in one liter of distilled water. Mix well and dissolve by heating with frequent agitation. Boil for one minute until complete dissolution. DO NOT OVERHEAT. Cool to 44-47 °C and use immediately.

#### Instructions for use

For the enumeration of coliforms according to ISO 4832:

- It is recommended the preparation of two dishes for the liquid product and/or from each dilution chosen.
- With a sterile pipette transfer 1 ml of liquid product or the appropriate dilutions to the center of each dish. Use another sterile pipette to inoculate each dilution into the dishes.



## Anexo N° 3

### Ficha técnica del medio de cultivo TBX



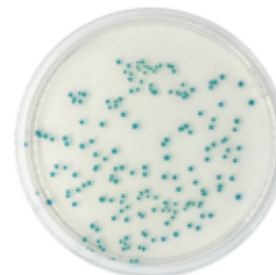
#### TBX Chromogenic Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide) ISO

Cat. 1151

Selective medium for the detection and enumeration of *Escherichia coli* in foods.

#### Practical information

Applications	Categories
Selective enumeration	<i>Escherichia coli</i>
Detection	<i>Escherichia coli</i>
Industry: Food	
Regulations: ISO 11133 / ISO 16649	



#### Principles and uses

TBX Chromogenic Agar (Tryptone Bile X-Glucuronide) is based on Tryptone Bile Salts Agar medium, used to detect and enumerate *E. coli* in foods, with the addition of a chromogenic agent, x-β-D-Glucuronide, to detect the presence of the enzyme glucuronidase, which is highly specific for *E. coli*.

The released chromophore in TBX Agar is colored and target colonies are easily identified. *E. coli* absorbs the chromogenic agent x-β-D-glucuronide, and the intracellular glucuronidase enzyme activity breaks the bond between the chromophore and the glucuronide. The released chromophore is colored and builds up within the cells, causing the *E. coli* colonies to be blue-green colored.

Casein peptone provides nitrogen, vitamins, minerals and amino acids essential for growth. Bile Salts are inhibitors to other Gram-positive organisms and suppress coliform bacteria. Bacteriological agar is the solidifying agent.

ISO 16649 specifies a horizontal method for the enumeration of β-glucuronidase-positive *E. coli* in products intended for human consumption or for the feeding of animals.

The negative β-glucuronidase *E. coli* colonies are colorless, e.g. *E. coli* O157: H7. The high temperatures (44°C) inhibit the growth of *E. coli* O157: H7.

#### Formula in g/L

Enzymatic digest of casein	20	Bacteriological agar	15
Bile salts N° 3	1,5	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronic acid	0,075

#### Preparation

Suspend 36,6 grams of the medium in one liter of distilled water. Mix well and dissolve by heating with frequent agitation. Boil for one minute until complete dissolution. Sterilize in autoclave at 121 °C for 15 minutes. Cool to 45-50 °C, mix well and dispense into plates.

#### Instructions for use

Enumeration of β-glucuronidase-positive *Escherichia coli* according to ISO 16649:

- Inoculate the TBX agar either by the plating method in depth, seeding on the surface or by the membrane filtration method.
- The membrane filtration method and the enumeration by the most probable number technique needs a previous resuscitation stage in Minerals Modified Glutamate Agar or Broth MMGA or MMGB (Cat. 1365).
- Incubate the plates of TBX agar for 21 hours at a temperature of 44 °C.
- Calculate the number of positive *Escherichia coli* β-glucuronidase colonies from the number of typical blue colonies.

## Anexo N° 4

### Ficha técnica del medio de cultivo CCA

#### The original medium used for the revised ISO 9308-1 (2014): Chromocult® Coliform Agar to be used to detect and enumerate *E. coli* and coliform bacteria in water

##### Introduction

The revised ISO 9308 part 1 (2014) with the amendment 1 (2016) describes the usage of membrane filtration and a chromogenic coliform agar for enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in:

- drinking water
- disinfected pool water
- finished water from treatment plants.

Our Chromocult® Coliform Agar (CCA) is the original: the only chromogenic culture medium which was used for all validation studies that were needed to prepare this new ISO 9308 -1 standard. The procedure takes much less time for positive results than the 48 hours needed for the previous ISO 9308 part 1 (2000) method using Lactose TTC agar, and the new method requires no additional culture media for result confirmation. In addition, Chromocult® Coliform Agar is a US EPA approved membrane filter medium that simultaneously determines the presence of total coliforms and *E. coli*, both of which must be monitored under the Total Coliform Rule at § 141.21.

##### The principle

Chromocult® Coliform Agar is a selective and differential chromogenic culture medium for the microbiological analysis of water samples. Within 24 hours this medium enables the simultaneous detection, differentiation and enumeration of *E. coli* and coliform bacteria in drinking water.

Counting of coliform bacteria is based on the ability of β-D-galactosidase, an enzyme which is characteristic of coliform bacteria, to cleave the substrate Salmon-GAL. The reaction results in salmon red colored coliform bacteria colonies.

Counting of *E. coli* is based on the cleavage of both the substrates X-glucuronide by β-D-glucuronidase and Salmon-GAL by β-D-galactosidase, an enzyme combination, which is characteristic of *E. coli*. In the presence of *E. coli* both substrates are cleaved, resulting in colonies that take on a dark blue to violet color as opposed to the salmon red of other coliform bacteria colonies. Non-coliform bacteria appear as colorless or in rare cases as turquoise colonies. The CCA formulation contains sodium heptadecylsulfate (e.g. Tergitol® 7) as an inhibitor of Gram-positive bacteria with no negative effect on the growth of the targeted coliform bacteria / *E. coli*.

##### Advantages

of the revised ISO 9308-1 method over ISO 9308-1 (2000):

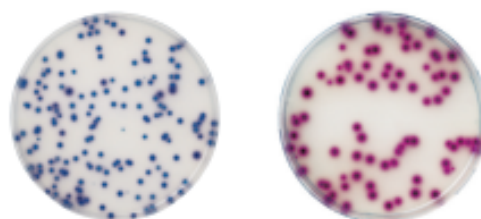
- **Save time:** Up to 24 hours faster than the old Lactose TTC agar method.
- **Clear results:** Easy counting of *E. coli* and coliform bacteria by color when using CCA.
- **Save costs:** No additional culture media needed for confirmation. Instead, one-minute confirmation of coliform bacteria using an inexpensive oxidase-based test strip.
- **Easier-to-do:** The CCA method is easier to perform than the Lactose TTC agar method.

##### Application

For water analysis, Chromocult® Coliform Agar is usually combined with membrane filtration:


- Filter appropriate volume of sample (e.g. 100 mL municipal drinking water, 250 mL bottled water) using membrane filter.
- Place filter on CCA ensuring that no air is trapped underneath.
- Incubate the inoculated dishes aerobically in an inverted position at 35-37 °C.
- After incubation, examine the plates for presence of typical colored colonies of *E. coli* and other coliform bacteria.

**NOTE:** The type and quality of membrane filter affects the size, coloration and number of colonies significantly. Our mixed cellulose ester filters were used in all ISO validation studies and supported the color formation and the growth of colonies very well. For more detailed information about the validation of CCA, including filter performance, see B. Lange, M. Strathmann, and R. Ossmer (2013). Letters Appl. Microbiol. 57, 547-553.



Anexo N° 5

Certificado de cepa *Escherichia coli* WDCM 00013


www.sigmaldrich.com

**Certified reference material – Vitroids™**  
**Reference material certificate**


***Escherichia coli* WDCM 00013 VT000136**

<b>Product no.:</b>	<b>VT000136</b>
<b>Lot no.:</b>	<b>BCCH3754</b>
<b>Description of CRM:</b>	Vitroids™ are disc-shaped, microbiological reference materials. Each disc contains a quantified number of microorganisms (colony forming units; cfu), immobilized in a solid water soluble matrix.
<b>Expiry date:</b>	<b>MAR 2024</b>
<b>Storage:</b>	<b>-20 ± 5 °C</b> ; store the mylar bag containing the plastic vials with the Vitroids™ unopened
<b>Starting material:</b>	<b>CECT 434 batch 23-03-2017</b> (freeze-dried microorganism in a glass ampoule)
<b>No. of passages:</b>	<b>2</b> (upon receipt from cell culture collection CECT)

Sample: <i>Escherichia coli</i> WDCM 00013 VT000136		
Certified value (geometric mean value)	Expanded uncertainty (log <sub>10</sub> value)	Expected range
<b>6.5E+03 cfu per disc</b>	0.034	<b>3.1E+03 - 1.3E+04 cfu per disc</b>
<b>Conditions: Tryptase Soy agar / aerobic / 37 °C / 24 hrs</b>		
<b>Date of testing: 31 MAR 2022</b>		

cfu: colony forming units  
 The reference values are calculated by (US EPA Environmental Systems Monitoring Laboratory in Cincinnati) EMGL-CIN's computer program "WEIGHT". The measurement of uncertainty originates from the generated blowight standard deviation (SD) resulting from the blowight geometric mean value obtained during homogeneity testing. The expected range takes into account media batch to batch variability, which is done by multiplying the blowight standard deviation by 1.6.


<b>Metrological traceability:</b>	Details see "Certification process details" on page 2.
<b>Measurement method:</b>	The certified value is established by plate counting in accordance with ISO/IEC 17025 <sup>1</sup> .
<b>Intended, correct use &amp; handling instructions:</b>	Please follow the instructions given in "General instructions for intended uses of this reference material" on page 3.
<b>Health and safety information:</b>	Please refer to the Safety Data Sheet (link on page 3) for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.
<b>Accreditation:</b>	Sigma-Aldrich Production GmbH is accredited by the Swiss Accreditation Service SAS as reference material producer under no. SRMS 0001 in accordance with international standard ISO 17034 <sup>1</sup> .
<b>Certificate issue date:</b>	<b>10 MAY 2022</b>



ISO 17034  
SRMS 0001




Dr. Thomas Bühret – CRM Operations




Dr. Philipp Zell – Approving Officer

Sigma-Aldrich Production GmbH, Industriestrasse 25, 9471 Buchs, Switzerland; Tel +41-81-755-2511  
 www.sigmaldrich.com  
 Sigma-Aldrich Production GmbH is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Certificate Page 1 of 3
Certificate version 01


## Anexo N° 6

Certificado de cepa *Enterococcus faecalis* WDCM 00087


www.sigmaldrich.com

### Certified reference material – Vitroids™ Reference material certificate


#### Enterococcus faecalis WDCM 00087 VT000877

**Product no.:** VT000877  
**Lot no.:** BCCH6770  
**Description of CRM:** Vitroids™ are disc-shaped, microbiological reference materials. Each disc contains a quantified number of microorganisms (colony forming units; cfu), immobilized in a solid water soluble matrix.  
**Expiry date:** MAY 2024  
**Storage:** -20 ± 5 °C; store the mylar bag containing the plastic vials with the Vitroids™ unopened  
**Starting material:** CECT 795 batch 04-11-2014 (freeze-dried microorganism in a glass ampoule)  
**No. of passages:** 2 (upon receipt from cell culture collection CECT)


Sample: Enterococcus faecalis WDCM 00087 VT000877		
Certified value (geometric mean value)	Expanded uncertainty (log <sub>10</sub> value)	Expected range
8.9E+04 cfu per disc	0.041	4.1E+04 - 2.0E+05 cfu per disc
<b>Conditions:</b> Trypcase soy agar / aerobic / 37 °C / 24 hrs		
<b>Date of testing:</b> 13 JUN 2022		

cfu: colony forming units  
 The reference values are calculated by (US EPA Environmental Systems Monitoring Laboratory in Cincinnati) EHSI-CIN's computer program "BIWEIGHT". The measurement of uncertainty originates from the generated biweight standard deviation (SD) resulting from the biweight geometric mean value obtained during homogeneity testing. The expected range takes into account media batch to batch variability, which is done by multiplying the biweight standard deviation by 1.6.


**Metrological traceability:** Details see "Certification process details" on page 2.  
**Measurement method:** The certified value is established by plate counting in accordance with ISO/IEC 17025<sup>®</sup>.  
**Intended, correct use & handling instructions:** Please follow the instructions given in "General instructions for intended uses of this reference material" on page 3.  
**Health and safety information:** Please refer to the Safety Data Sheet (link on page 3) for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.  
**Accreditation:** Sigma-Aldrich Production GmbH is accredited by the Swiss Accreditation Service SAS as reference material producer under no. SRMS 0001 in accordance with international standard ISO 17034<sup>®</sup>.  
**Certificate issue date:** 20 SEP 2022



ISO 17034  
SRMS 0001




Dr. Thomas Bühner – CRM Operations




Dr. Philipp Zell – Approving Officer

Sigma-Aldrich Production GmbH, Industriestrasse 25, 9471 Buchs, Switzerland; Tel +41-01-755-2511  
 www.sigmaldrich.com  
 Sigma-Aldrich Production GmbH is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Certificate Page 1 of 3
Certificate version 01


Anexo N° 7

Certificado de cepa *Citrobacter freundii* WDCM 00006



www.sigmaaldrich.com

**Certificate of Analysis – Vitroids™ (microbiological CRM)**

***Citrobacter freundii* WDCM 00006 VT000066**


**Product no.:** VT000066  
**Lot no.:** BCCG5145  
**Description of CRM:** Vitroids™ are disc-shaped, microbiological reference materials. Each disc contains a quantified number of microorganisms (colony forming units; cfu), immobilized in a solid water soluble matrix.  
**Expiry date:** OCT 2023  
**Storage:** -20 ± 5 °C; store the mylar bag containing the plastic vials with the Vitroids™ unopened  
**Starting material:** CECT 7464 batch 11-05-2017 (freeze-dried microorganism in a glass ampoule)  
**No. of passages:** 2 (upon receipt from cell culture collection CECT)


Sample: <i>Citrobacter freundii</i> WDCM 00006 VT000066		
Certified value (geometric mean value)	Expanded uncertainty (log <sub>10</sub> value)	Expected range
3.1E+03 cfu per disc	0.027	1.6E+03 - 6.0E+03 cfu per disc
Conditions:	Tryptcase Soy agar / aerobic / 37 °C / 24 hrs	
Date of testing:	25 OCT 2021	


cfu: colony forming units  
 The reference values are calculated by (US EPA Environmental Systems Monitoring Laboratory in Cincinnati) EMSL-CIN's computer program "BIWEIGHT". The measurement of uncertainty originates from the generated biweight standard deviation (SD) resulting from the biweight geometric mean value obtained during homogeneity testing. The expected range takes into account media batch to batch variability, which is done by multiplying the biweight standard deviation by 1.6.

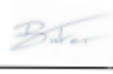
**Metrological traceability:** Details see "Certification process details" on page 2.  
**Measurement method:** The certified value is established by plate counting.  
**Intended, correct use & handling instructions:** Please follow the instructions given in "General instructions for intended uses of this reference material" on page 3.  
**Health and safety information:** Please refer to the Safety Data Sheet (link on page 3) for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.  
**Accreditation:** Sigma-Aldrich Production GmbH is accredited by the Swiss accreditation authority SAS as registered reference material producer SRMS 0001 in accordance with ISO 17034 [1] and registered testing laboratory STS 0490 according to ISO/IEC 17025 [1].


**Certificate issue date:** 25 NOV 2021

  
 ISO 17034  
 SRMS 0001

  
 ISO/IEC 17025  
 STS 0490


  
 ISO 9001  
 000356 QM08

  
 Dr. Thomas Bühner – CRM Operations

  
 Dr. Philipp Zell – Approving Officer


Sigma-Aldrich Production GmbH, Industriestrasse 25, 9471 Buchs, Switzerland; Tel +41-81-750-2511  
 www.sigmaaldrich.com  
 Sigma-Aldrich Production GmbH is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Certificate Page 1 of 3 Certificate version 01



Anexo N° 8

Certificado de cepa *Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00025


www.sigmaaldrich.com

**Certified reference material – Vitroids™**  
**Reference material certificate**


***Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00025 VT000256**

<b>Product no.:</b>	<b>VT000256</b>
<b>Lot no.:</b>	<b>BCCH6763</b>
<b>Description of CRM:</b>	Vitroids™ are disc-shaped, microbiological reference materials. Each disc contains a quantified number of microorganisms (colony forming units; cfu), immobilized in a solid water soluble matrix.
<b>Expiry date:</b>	<b>JUN 2024</b>
<b>Storage:</b>	<b>-20 ± 5 °C</b> ; store the mylar bag containing the plastic vials with the Vitroids™ unopened
<b>Starting material:</b>	<b>CECT 108 batch 09-05-2017</b> (freeze-dried microorganism in a glass ampoule)
<b>No. of passages:</b>	<b>2</b> (upon receipt from cell culture collection CECT)


Sample: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00025 VT000256		
Certified value (geometric mean value)	Expanded uncertainty (log <sub>10</sub> value)	Expected range
<b>6.0E+03 cfu per disc</b>	0.039	<b>2.8E+03 - 1.3E+04 cfu per disc</b>
<b>Conditions:</b> <b>Trypcase soy agar / aerobic / 37 °C / 24 hrs</b>		
<b>Date of testing:</b> 11 JUL 2022		

**cfu:** colony forming units  
 The reference values are calculated by US EPA Environmental Systems Monitoring Laboratory in Cincinnati) EMS-CIN's computer program "WISGENT". The measurement of uncertainty originates from the generated blowight standard deviation (SD) resulting from the blowight geometric mean value obtained during homogeneity testing. The expected range takes into account media batch to batch variability, which is done by multiplying the blowight standard deviation by 1.6.


<b>Metrological traceability:</b>	Details see "Certification process details" on page 2.
<b>Measurement method:</b>	The certified value is established by plate counting in accordance with ISO/IEC 17025 <sup>1</sup> .
<b>Intended, correct use &amp; handling instructions:</b>	Please follow the instructions given in "General instructions for intended uses of this reference material" on page 3.
<b>Health and safety information:</b>	Please refer to the Safety Data Sheet (link on page 3) for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.
<b>Accreditation:</b>	Sigma-Aldrich Production GmbH is accredited by the Swiss Accreditation Service SAS as reference material producer under no. SRMS 0001 in accordance with international standard ISO 17034 <sup>1,2</sup> .
<b>Certificate issue date:</b>	<b>26 SEP 2022</b>



ISO 17034  
SRMS 0001




Dr. Thomas Bühner – CRM Operations




Dr. Philipp Zell – Approving Officer

Sigma-Aldrich Production GmbH, Industriestrasse 25, 9471 Buchs, Switzerland; Tel +41-81-755-2511  
 www.sigmaaldrich.com  
 Sigma-Aldrich Production GmbH is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Certificate Page 1 of 3
Certificate version 01


Anexo N° 9

Certificado de cepa *Salmonella enterica* WDCM 00030



www.sigmaaldrich.com

### Certified reference material – Vitroids™

#### Reference material certificate


**Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis WDCM 00030 VT000303**

**Product no.:** VT000303  
**Lot no.:** BCCG2047  
**Description of CRM:** Vitroids™ are disc-shaped, microbiological reference materials. Each disc contains a quantified number of microorganisms (colony forming units; cfu), immobilized in a solid water soluble matrix.  
**Expiry date:** JUL 2024  
**Storage:** -20 ± 5 °C; store the mylar bag containing the plastic vials with the Vitroids™ unopened  
**Starting material:** CECT 4300 batch 22-07-2015 (freeze-dried microorganism in a glass ampoule)  
**No. of passages:** 2 (upon receipt from cell culture collection CECT)


Sample: <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis WDCM 00030 VT000303		
Certified value (geometric mean value)	Expanded uncertainty (log <sub>10</sub> value)	Expected range
1.0E+02 cfu per disc	0.042	4.6E+01 - 2.3E+02 cfu per disc
Conditions:	Trypcase soy agar / aerobic / 37 °C / 24 hrs	
Date of testing:	11 AUG 2022	

cfu: colony forming units  
 The reference values are calculated by (US EPA Environmental Systems Monitoring Laboratory in Cincinnati) DMSL-CM's computer program "BIWEIGHT". The measurement of uncertainty originates from the generated biweight standard deviation (SD) resulting from the biweight geometric mean value obtained during homogeneity testing. The expected range takes into account media batch to batch variability, which is done by multiplying the biweight standard deviation by 1.6.


**Metrological traceability:** Details see "Certification process details" on page 2.  
**Measurement method:** The certified value is established by plate counting in accordance with ISO/IEC 17025<sup>1)</sup>.  
**Intended, correct use & handling instructions:** Please follow the instructions given in "General instructions for intended uses of this reference material" on page 3.  
**Health and safety information:** Please refer to the Safety Data Sheet (link on page 3) for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.  
**Accreditation:** Sigma-Aldrich Production GmbH is accredited by the Swiss Accreditation Service SAS as reference material producer under no. SRMS 0001 in accordance with international standard ISO 17034<sup>2)</sup>.  
**Certificate issue date:** 07 SEP 2022



ISO 17034  
SRMS 0001




Dr. Thomas Bühner - CRM Operations



Dr. Philipp Zöll - Approving Officer


Sigma-Aldrich Production GmbH, Industriestrasse 25, 9471 Buchs, Switzerland; Tel +41-91-755-2511  
 www.sigmaaldrich.com  
 Sigma-Aldrich Production GmbH is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Certificate Page 1 of 3      Certificate version 01



Anexo N° 10

Certificado de cepa *Staphylococcus aureus* WDCM 00034


www.sigmaaldrich.com

**Certificate of Analysis – Vitroids™ (microbiological CRM)**


***Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* WDCM 00034 VT000343**

**Product no.:** VT000343  
**Lot no.:** BCCF8571  
**Description of CRM:** Vitroids™ are disc-shaped, microbiological reference materials. Each disc contains a quantified number of microorganisms (colony forming units; cfu), immobilized in a solid water soluble matrix.  
**Expiry date:** APR 2024  
**Storage:** -20 ± 5 °C; store the mylar bag containing the plastic vials with the Vitroids™ unopened  
**Starting material:** CECT 435 batch 04-05-2017 (freeze-dried microorganism in a glass ampoule)  
**No. of passages:** 2 (upon receipt from cell culture collection CECT)


Sample: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> WDCM 00034 VT000343		
Certified value (geometric mean value)	Expanded uncertainty (log <sub>e</sub> value)	Expected range
1.2E+02 cfu per disc	0.022	6.2E+01 - 2.2E+02 cfu per disc
<b>Conditions:</b> Tryptase Soy Agar / aerobic / 37 °C / 48 hrs		
<b>Date of testing:</b> 03 MAY 2022		

cfu: colony forming units  
 The reference values are calculated by (US EPA Environmental Systems Monitoring Laboratory in Cincinnati) EMS-CM's computer program "BWEIGHT". The measurement of uncertainty originates from the generated biweight standard deviation (SD) resulting from the biweight geometric mean value obtained during homogeneity testing. The expected range takes into account media batch to batch variability, which is done by multiplying the biweight standard deviation by 1.6.


**Metrolological traceability:** Details see "Certification process details" on page 2.  
**Measurement method:** The certified value is established by plate counting.  
**Intended, correct use & handling instructions:** Please follow the instructions given in "General instructions for intended uses of this reference material" on page 3.  
**Health and safety information:** Please refer to the Safety Data Sheet (link on page 3) for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.  
**Accreditation:** Sigma-Aldrich Production GmbH is accredited by the Swiss accreditation authority SAS as registered reference material producer SRM5 0001 in accordance with ISO 17034 [1] and registered testing laboratory STS 0490 according to ISO/IEC 17025 [2].  
**Certificate issue date:** 26 AUG 2022




ISO 17034  
SRM5 0001



ISO/IEC 17025  
STS 0490




ISO 9001  
005256 QMSB


---


Dr. Thomas Böhner – CRM Operations


---

Dr. Philipp Zell – Approving Officer


Sigma-Aldrich Production GmbH, Industriestrasse 25, 9471 Buche, Switzerland; Tel +41-81-755-2511  
www.sigmaaldrich.com  
Sigma-Aldrich Production GmbH is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.



Certificate Page 1 of 3 Certificate version 01

Anexo N° 11

Certificado de cepa *Staphylococcus saprophyticus* WDCM 00159


www.sigmaaldrich.com

### Certificate of Analysis – Vitroids™ (microbiological CRM)

***Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* WDCM 00159 VT001596**


**Product no.:** VT001596  
**Lot no.:** BCCG6159  
**Description of CRM:** Vitroids™ are disc-shaped, microbiological reference materials. Each disc contains a quantified number of microorganisms (colony forming units; cfu), immobilized in a solid water soluble matrix.  
**Expiry date:** NOV 2023  
**Storage:** -20 ± 5 °C; store the mylar bag containing the plastic vials with the Vitroids™ unopened  
**Starting material:** CECT 235 batch 22-11-2016 (freeze-dried microorganism in a glass ampoule)  
**No. of passages:** 2 (upon receipt from cell culture collection CECT)


Sample: <i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> WDCM 00159 VT001596		
Certified value (geometric mean value)	Expanded uncertainty (log <sub>10</sub> value)	Expected range
6.3E+03 cfu per disc	0.034	3.1E+03 - 1.3E+04 cfu per disc
<b>Conditions:</b>		<b>Trypcase Soy agar / aerobic / 37 °C / 48 hrs</b>
<b>Date of testing:</b>		22 NOV 2021


cfu: colony forming units  
 The reference values are calculated by US EPA Environmental Systems Monitoring Laboratory in Cincinnati) EMSL-CIV's computer program "BIWEIGHT". The measurement of uncertainty originates from the generated biweight standard deviation (SD) resulting from the biweight geometric mean value obtained during homogeneity testing. The expected range takes into account media batch to batch variability, which is done by multiplying the biweight standard deviation by 1.6.


**Metrological traceability:** Details see "Certification process details" on page 2.  
**Measurement method:** The certified value is established by plate counting.  
**Intended, correct use & handling instructions:** Please follow the instructions given in "General instructions for intended uses of this reference material" on page 3.  
**Health and safety information:** Please refer to the Safety Data Sheet (link on page 3) for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.  
**Accreditation:** Sigma-Aldrich Production GmbH is accredited by the Swiss accreditation authority SAS as registered reference material producer SRMS 0001 in accordance with ISO 17034 [1] and registered testing laboratory STS 0490 according to ISO/IEC 17025 [2].


**Certificate issue date:** 22 DEC 2021

  
 ISO 17034  
SRMS 0001


  
 ISO/IEC 17025  
STS 0490

  
 ISO 9001  
005 256 QM08

  
 Dr. Thomas Bühner – CRM Operations

  
 Dr. Philipp Zell – Approving Officer

Sigma-Aldrich Production GmbH, Industriestrasse 25, 9471 Buchs, Switzerland; Tel +41-61-755-2511  
 www.sigmaaldrich.com  
 Sigma-Aldrich Production GmbH is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Certificate Page 1 of 3
Certificate version 01


**Anexo N° 12**


Estudio de exclusividad del método alternativo frente a los métodos de referencia con vancomicina

**Tabla N° 28** Crecimiento y color de colonia de las cepas de *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. saprophyticus* y *Salmonella entérica* incubadas en CCA con vancomicina a 35 °C por 24 h

<b>Microorganismos</b>	<b>Número de origen</b>	<b>Color de colonia</b>	<b>Salmon-GAL B-D-galactosidasa</b>	<b>X-glucuronidasa B-D-glucuronidasa</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00009	Blanco	Negativo	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	Sin color	Negativo	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034	-	-	-
<i>Salmonella entérica</i>	WDCM 00030	Sin color	Negativo	Negativo
<i>Staphylococcus Saprophyticus</i>	WDCM 00159	-	-	-

### Anexo N° 13

Certificado N° 020902 del medio de cultivo Chromocult Coliform Agar por el programa  
AOAC Performance Tested

  
**CERTIFICATION**  
**AOAC® Performance Tested<sup>SM</sup>**

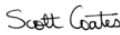
Certificate No.  
**020902**

The AOAC Research Institute hereby certifies the method known as:

**Chromocult® Coliform Agar**

manufactured by  
**Merck KGaA**  
Frankfurter Str. 250  
64293 Darmstadt  
Germany

This method has been evaluated in the AOAC® *Performance Tested Methods<sup>SM</sup>* Program and found to perform as stated by the manufacturer contingent to the comments contained in the manuscript. This certificate means that an AOAC® Certification Mark License Agreement has been executed which authorizes the manufacturer to display the AOAC *Performance Tested<sup>SM</sup>* certification mark along with the statement - "THIS METHOD'S PERFORMANCE WAS REVIEWED BY AOAC RESEARCH INSTITUTE AND WAS FOUND TO PERFORM TO THE MANUFACTURER'S SPECIFICATIONS" - on the above-mentioned method for a period of one calendar year from the date of this certificate (February 07, 2022 – December 31, 2022). Renewal may be granted at the end of one year under the rules stated in the licensing agreement.

 _____ Scott Coates, Senior Director Signature for AOAC Research Institute	<u>February 07, 2022</u> Date
--	----------------------------------

2275 Research Blvd., Ste. 300, Rockville, Maryland, USA Telephone: +1-301-924-7077 Fax: +1-301-924-7089  
Internet e-mail: [aoacri@aoac.org](mailto:aoacri@aoac.org) \* World Wide Web Site: <http://www.aoac.org>



Merck Chromocult® Coliform Agar, AOAC® Performance Tested™ Certification Number 020902

**Table 8. Inclusivity study: growth and colony color of coliform and *E. coli* strains incubated on Chromocult Coliform Agar at 35°C for 24 h (1)**

Species	Origin	Number	Inoculum (cfu/plate)	Growth	Salmon-GAL $\beta$ -D-galactosidase	X-Glucuronide $\beta$ -D-glucuronidase	Colony color <sup>a</sup>
1. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	25922	30-100	+	+	+	dark blue to violet
2. <i>Escherichia coli</i>	DSMZ	502	30-100	+	+	+	dark blue to violet
3. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	8739	30-100	+	+	+	dark blue to violet
4. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	35218	30-100	+	+	+	dark blue to violet
5. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	11105	30-100	+	+	+	dark blue to violet
6. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	11229	30-100	+	+	+	dark blue to violet
7. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	10536	30-100	+	+	+	dark blue to violet
8. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	51739	30-100	+	+	+	dark blue to violet
9. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	49161	30-100	+	+	+	dark blue to violet
10. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	35421	30-100	+	+	+	dark blue to violet
11. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	35270	30-100	+	+	+	dark blue to violet
12. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	33582	30-100	+	+	+	dark blue to violet
13. <i>Escherichia coli</i>	ATCC	11775	30-100	+	+	+	dark blue to violet
14. <i>Escherichia fergusonii</i>	ATCC	35470	30-100	+	+	-	salmon-red
15. <i>Escherichia fergusonii</i>	ATCC	35469	30-100	+	+	-	salmon-red
16. <i>Escherichia hermannii</i>	ATCC	33650	30-100	+	+	-	salmon-red
17. <i>Escherichia hermannii</i>	ATCC	33651	30-100	+	+	-	salmon-red
18. <i>Escherichia hermannii</i>	ATCC	33652	30-100	+	+	-	salmon-red
19. <i>Escherichia intermedia</i>	ATCC	21073	30-100	+	+	-	salmon-red
20. <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	13048	30-100	+	+	-	salmon-red
21. <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	15038	30-100	+	+	-	salmon-red
22. <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	35028	30-100	+	+	-	salmon-red
23. <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	35029	30-100	+	+	-	salmon-red
24. <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	29940	30-100	+	+	-	salmon-red
25. <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC	51342	30-100	+	+	-	salmon-red
26. <i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC	13047	30-100	+	+	-	salmon-red

<sup>a</sup> Typical appearance of *E. coli* (Gal +, Gluc +): dark blue to violet

Typical appearance of coliforms (Gal +, Gluc -): salmon-red

Species	Origin	Number	Inoculum (cfu/plate)	Growth	Salmon-GAL $\beta$ -D-galactosidase	x-Glucuronide $\beta$ -D-glucuronidase	Colony color <sup>a</sup>
27. <i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC	29006	30-100	+	+	-	salmon-red
28. <i>Enterobacter cloacae</i>	NCTC	9394	30-100	+	+	-	salmon-red
29. <i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC	29941	30-100	+	+	-	salmon-red
30. <i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC	35030	30-100	+	+	-	salmon-red
31. <i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC	35549	30-100	+	+	-	salmon-red
32. <i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC	51329	30-100	+	+	-	salmon-red
33. <i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC	12868	30-100	+	+	-	salmon-red
34. <i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC	29004	30-100	+	+	-	salmon-red
35. <i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC	29544	30-100	+	+	-	salmon-red
36. <i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC	43165	30-100	+	+	-	salmon-red
37. <i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC	49334	30-100	+	+	-	salmon-red
38. <i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC	13182	30-100	+	+	-	salmon-red
39. <i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC	8724	30-100	+	+	-	salmon-red
40. <i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC	33531	30-100	+	+	-	salmon-red
41. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC	13883	30-100	+	+	-	salmon-red
42. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC	10031	30-100	+	+	-	salmon-red
43. <i>Citrobacter braakii</i>	ATCC	6750	30-100	+	+	-	salmon-red
44. <i>Citrobacter freundii</i>	ATCC	8454	30-100	+	+	-	salmon-red
45. <i>Citrobacter freundii</i>	ATCC	8090	30-100	+	+	-	salmon-red
46. <i>Citrobacter freundii</i>	ATCC	43864	30-100	+	+	-	salmon-red
47. <i>Citrobacter freundii</i>	ATCC	6879	30-100	+	+	-	salmon-red
48. <i>Citrobacter freundii</i>	ATCC	11811	30-100	+	+	-	salmon-red
49. <i>Citrobacter koseri</i>	ATCC	27028	30-100	+	+	-	salmon-red
50. <i>Citrobacter koseri</i>	ATCC	27156	30-100	+	+	-	salmon-red
51. <i>Citrobacter ssp.</i>	ATCC	51642	30-100	+	+	-	salmon-red
52. <i>Citrobacter ssp.</i>	ATCC	51378	30-100	+	+	-	salmon-red
53. <i>Citrobacter youngae</i>	ATCC	29221	30-100	+	+	-	salmon-red

Typical appearance of *E. coli* (Gal +, Gluc +): dark blue to violet

Typical appearance of coliforms (Gal +, Gluc -): salmon-red

Merck Chromocult® Coliform Agar, AOAC® Performance Tested™ Certification Number 020902

Table 9. Exclusivity study: growth and colony color of non-coliform strains incubated on Chromocult Coliform Agar at 35°C for 24 h (1)

Species	Origin	Number	Inoculum (cfu/plate)	Growth	Salmon-GAL $\beta$ -D-galactosidase	x-Glucuronide $\beta$ -D-glucuronidase	Colony color
1. Acinetobacter baumannii	ATCC	19606	100-300	+	-	-	colorless
2. Aeromonas hydrophila	ATCC	7966	100-300	+	-	-	colorless
3. Alcaligenes faecalis	ATCC	19209	100-300	+	-	-	colorless
4. Bacillus cereus	ATCC	11778	100-300	-	-	-	
5. Bacillus pumilus	ATCC	27142	100-300	-	-	-	
6. Bacillus subtilis	ATCC	6051	100-300	-	-	-	
7. Campylobacter jejuni	ATCC	29428	100-300	-	-	-	
8. Clostridium perfringens	ATCC	13124	100-300	-	-	-	
9. Edwardsiella tarda	ATCC	15947	100-300	+	-	-	colorless
10. Hafnia alvei	ATCC	29926	100-300	+	-	-	colorless
11. Lactobacillus acidophilus	ATCC	4356	100-300	-	-	-	
12. Microbacterium lacticum	DSMZ	20427	100-300	-	-	-	
13. Micrococcus luteus	ATCC	10240	100-300	-	-	-	
14. Morganella morganii	ATCC	25830	100-300	+	-	-	colorless
15. Morganella morganii	ATCC	8019	100-300	+	-	-	colorless
16. Proteus mirabilis	ATCC	14153	100-300	+	-	-	colorless
17. Proteus mirabilis	ATCC	14273	100-300	+	-	-	colorless
18. Proteus mirabilis	ATCC	29906	100-300	+	-	-	colorless
19. Proteus vulgaris	ATCC	13315	100-300	+	-	-	colorless
20. Proteus vulgaris	ATCC	8427	100-300	+	-	-	colorless
21. Providencia rustigiannii	ATCC	13159	100-300	+	-	-	colorless
22. Pseudomonas aeruginosa	ATCC	27853	100-300	+	-	-	colorless
23. Pseudomonas aeruginosa	ATCC	9027	100-300	+	-	-	colorless
24. Pseudomonas alcaligenes	ATCC	14909	100-300	+	-	-	colorless
25. Pseudomonas fluorescens	ATCC	13525	100-300	-	-	-	
26. Pseudomonas putida	ATCC	12633	100-300	+	-	-	colorless
27. Pseudomonas stutzeri	ATCC	17832	100-300	+	-	-	colorless

Species	Origin	Number	Inoculum (cfu/plate)	Growth	Salmon-GAL $\beta$ -D-galactosidase	x-Glucuronide $\beta$ -D-glucuronidase	Colony color
28. Salmonella Anatum	ATCC	9270	100-300	+	-	+	turquoise
29. Salmonella Choleraesuis	NCTC	6017	100-300	+	-	-	colorless
30. Salmonella Choleraesuis	ATCC	12011	100-300	+	-	-	colorless
31. Salmonella Enteritidis	ATCC	13076	100-300	+	-	-	colorless
32. Salmonella Typhimurium	ATCC	13113	100-300	+	-	-	colorless
33. Serratia plymuthica	ATCC	7462	100-300	-	-	-	
34. Shigella boydii	ATCC	8702	100-300	+	-	+	turquoise
35. Shigella flexneri	ATCC	12022	100-300	+	-	-	colorless
36. Shigella flexneri	ATCC	12025	100-300	+	-	-	colorless
37. Shigella flexneri	ATCC	12023	100-300	+	-	+	turquoise
38. Shigella sonnei	ATCC	29930	100-300	+	-	-	colorless
39. Shigella sonnei	ATCC	11060	100-300	+	-	-	colorless
40. Staphylococcus aureus	ATCC	6538p	100-300	-	-	-	
41. Staphylococcus saprophyticus	ATCC	15305	100-300	-	-	-	
42. Streptococcus pyogenes	ATCC	12344	100-300	-	-	-	
43. Yersinia intermedia	ATCC	29909	100-300	+	-	-	colorless
44. Yersinia enterocolitica	ATCC	23715	100-300	+	-	-	colorless



**Anexo N° 14**

## Verificación de los equipos del laboratorio

**Tabla N° 29**

Requisito y frecuencia de los equipos utilizados en la validación

<b>Equipos</b>	<b>Requisitos</b>	<b>Frecuencia</b>
Incubadora	Verificar la estabilidad de la temperatura	Diariamente
Autoclave	Verificar las características de esterilización y la eficacia del equipo con un test biológico	Cada 2 años
Balanza	Verificar con una pesa de control	Diariamente
Micropipetas	Verificar la exactitud	Mensualmente
Condiciones ambientales (microbiológicas)	Control de las superficies y el aire del laboratorio	Semanalmente
Condiciones ambientales (temperatura y humedad)	Control de la temperatura y humedad del laboratorio	Diariamente

Se examinó la calibración, el mantenimiento de todos los equipos empleados. En el caso de equipos que no estaban calibrados, se realizó una comprobación. Esto garantiza la fiabilidad de los resultados obtenidos en la investigación.

**Anexo N° 15**

## Control de la autoclave

Se realizó la confirmación de esterilización de la autoclave utilizada en la presente investigación, se llevó a cabo con un bioindicador que contiene esporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953. Para la verificación se colocó la ampolla que contiene estas esporas dentro de la autoclave en una botella esterilizada con agua esterilizada por un tiempo de 15 minutos a una temperatura de 121 °C, al finalizar se llevó a incubar a 60 °C durante 48 horas, y de la misma forma se incubó otra ampolla no esterilizada como control. Después de las 48 horas, se mantuvo el color violeta rojizo en la ampolla esterilizada indicando la ausencia de crecimiento de las esporas, por otro lado, en la ampolla no esterilizada si hubo un viraje de color hacia el amarillo con la presencia de turbidez por la fermentación de azúcar y el crecimiento de las esporas.

**Gráfico N° 16**

Esterilización suficiente con Sterikon  
plus bioindicador MERCK



**Fuente:** Autor

**Gráfico N° 17**

Control positivo con Sterikon plus  
bioindicador MERCK



**Fuente:** Autor

En la primera imagen se puede observar el resultado satisfactorio de la verificación de la autoclave con el uso de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 y en la segunda imagen su respectivo control positivo, por lo tanto, se pudo afirmar que el equipo asegura una correcta esterilización y cumple con las especificaciones establecidas por el LECC para el desarrollo de la validación.



**Anexo N° 17**

Control de ambientes

El laboratorio fue objeto de monitoreo semanal, centrándose en áreas específicas como el área de preparación de materiales y la cabina de flujo laminar vertical. Para evaluar la calidad del aire, se utilizó la técnica de sedimentación, colocando placas con medio de cultivo para bacterias mesófilos (Agar PC) y hongos (Agar OGYE) en diferentes puntos del laboratorio durante 15 minutos. De manera similar, las superficies fueron monitoreadas mediante gasas, tomando una muestra representativa de un área aproximada de 25 cm<sup>2</sup>. Posteriormente, estas muestras fueron incubadas a 37 °C en el caso del agar nutritivo y PC, y 22 °C en el agar OGYE.

Luego del periodo de incubación, se llevó a cabo el recuento en cada una de las placas, confirmando la ausencia de contaminación en el área. De esa manera, se aseguró la validez de cada parámetro de la validación, ya que la limpieza tanto del laboratorio como del área de siembra evitó la contaminación cruzada.

**Tabla N° 30**

Resultados del control microbiológico de ambiente y superficie

Ensayos	Ambiente UFC / hora				Superficie UFC / 25 cm <sup>2</sup>				Analista			
	Cabina		Área		Cabina		Área		Guantes inicio		Guantes final	
	M	HyL	M	HyL	M	HyL	M	HyL	M	HyL	M	HyL
	0	0	Max 10	Max 10	0	0	Max 10	Max 10	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>CUMPLE</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>

\* **M:** bacterias mesófilas **H:** hongos **L:** levaduras

Durante el desarrollo de la validación, se obtuvieron resultados confiables en el control microbiológico de los ambientes, superficies y analistas. La tabla N° 29 muestra que los controles microbiológicos cumplen con las especificaciones establecidas por el LECC. Esto garantiza que las condiciones de trabajo sean óptimas durante las pruebas realizadas, así mismo ayuda a reducir los falsos positivos debido a la contaminación microbiana cruzada. Esto se logra a través de un riguroso proceso de higiene y desinfección en el laboratorio, especialmente en el área de trabajo, lo cual es primordial para obtener resultados confiables durante la validación.

**Anexo N° 18**

## Verificación de medios de cultivo

Se llevaron a cabo controles sobre los medios de cultivo utilizados en la investigación, tal como un control macroscópico, una medición del pH a 25 °C, un control de esterilidad y un estudio de productividad.

**1. Control macroscópico**

Se realizó una revisión visual para evaluar la consistencia del medio, su color y su apariencia. Todas estas características se compararon con las especificaciones detalladas del medio en la ficha técnica correspondiente. En la siguiente tabla se aprecian los resultados de las características macroscópicas de los medios de cultivo utilizados en la presente investigación, y se evidencia que presentan las mismas especificaciones que se detallan en su ficha técnica correspondiente.

**Tabla N° 31**

Resultados de las características macroscópicas de los medios de cultivo utilizados en la validación

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Características macroscópicas</b>
Agar CCA	Color beige, granulado, consistencia fina y homogénea sin presencia de humedad.
Agar VRBL	Color violeta, granulado, consistencia fina homogénea sin presencia de humedad.
Agar TBX	Color beige, granulado, consistencia fina y homogénea sin presencia de humedad.

**2. Control de esterilidad**

Se distribuyeron las placas de Petri con el medio de cultivo seleccionado para la siembra correspondiente. Estos recipientes con el medio de cultivo fueron incubados a una temperatura de 37 °C (CCA y VRBL) y 44 °C (TBX) durante 24 horas. Al finalizar el

periodo de incubación, se confirmó la ausencia de crecimiento en las placas, de esta manera se evidenció que los medios estuvieran correctamente esterilizados.

### 3. Control de pH

Se extrajo una muestra del medio preparado a una temperatura de 25 °C y se determinó el pH utilizando un papel indicador. Se comparó el valor obtenido con el indicado en la ficha técnica de cada uno de los medios de cultivo con un margen de +/- 2. En la siguiente tabla se muestran los resultados del pH medido utilizando una tira indicadora. Se comparó el valor obtenido teniendo como resultado el mismo de la ficha técnica correspondiente de cada medio de cultivo.

**Tabla N° 32**

Resultados de la medición de pH de los medios de cultivo utilizados en la validación

Medio de cultivo	Valor de pH
Agar CCA	7
Agar VRBL	7.3
Agar TBX	7.2

La verificación de los medios de cultivo, se realizó mediante un control macroscópico, evaluando la consistencia del medio, el color y la apariencia; todas estas características fueron comparadas con las fichas técnicas correspondientes de cada medio y se pudo afirmar que todos los medios se encontraban en excelente estado para poder ser utilizados en la validación. Además, se realizó un control de esterilidad, que consistió en distribuir en las placas de Petri el medio de cultivo, luego fueron incubados a una temperatura de 37 °C y 44 °C durante 24 horas, después de este periodo se pudo confirmar la ausencia de crecimiento microbiano en las placas, por lo tanto, se puede garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta investigación. Por último, se llevó a cabo un control de pH, que se basa en extraer una muestra del medio preparado a una temperatura de 25 °C y se analizó el pH utilizando un papel indicador, para luego ser comparados con el valor en la ficha técnica de cada medio cultivo y se pudo confirmar que se encuentran dentro del

rango establecido, por lo tanto, nos asegura que los medios de cultivo se encuentran aptos para su uso en la validación.



**Anexo N° 19****Reconstitución de cepas bacterianas WDCM**

Las cepas WDCM (World Data Centre for Microorganisms) fueron disueltas en el medio de cultivo que indica la ficha técnica correspondiente. En todas las cepas, el medio de cultivo de reconstitución es el caldo Soya Tripticasa. El volumen depende de cada cepa, ya que la cantidad de UFC/disco es diferente y también del rango de contaminación objetivo para realizar cada parámetro de la validación.

**Gráfico N° 18****Reconstitución del disco de la cepa WDCM en caldo TSA****Fuente:** Autor

**Anexo N° 20****Revitalización y cuantificación de las cepas bacterianas WDCM**

Los primeros discos de cada cepa bacteriana, fueron disueltos en el volumen de caldo Soya Trypticasa correspondiente para cada cepa para realizar los parámetros cualitativos de exclusividad e inclusividad. Posterior a esto, se realizó la revitalización de las cepas bacterianas en base a la ficha técnica correspondiente de cada bacteria.

**a. Materiales y reactivos**

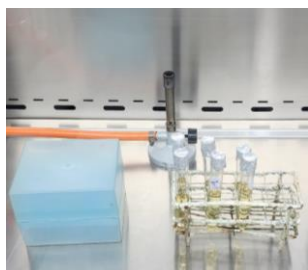
Se utilizaron tubos de ensayo con una cantidad de 9 mL de caldo Soya Trypticasa, cepa bacteriana WDCM, micropipeta, puntas estériles, gradilla y una incubadora.

**b. Procedimiento**

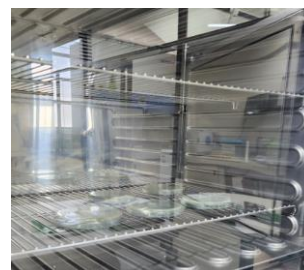
- Se tomó 1 mL de las cepas WDCM reconstituidas en caldo Soya Trypticasa.
- Luego se transfirió a un tubo de ensayo con 9 mL de caldo Soya Trypticasa.
- Una vez homogeneizado el tubo de ensayo, este fue llevado a incubación a 37 °C por 24 h aproximadamente.
- Pasadas las 24 h de incubación se verificó la turbidez y se procedió a sembrar en el medio de cultivo CCA para conocer la verdadera concentración para realizar los análisis respectivos.

**Gráfico N° 19**

Revitalización de las cepas WDCM en  
caldo TSA

**Fuente:** Autor**Gráfico N° 20**

Incubación del inóculo en agar CCA por  
24 h

**Fuente:** Autor