

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or religious figure, standing on a globe. The figure is surrounded by various symbols, including a crown, a cross, and a lion. The text "UNIVERSITAS CAROLINA ACADÉMICA COACTEMALENSIS" is inscribed around the perimeter of the seal. The background of the seal is a light blue and green gradient.

Verificación del método Simplate® Total Plate Count Color Indicator (TPC CI), comparado con el método estándar de recuento en placa por vertido, para el recuento total de microorganismos aeróbicos mesófilos en productos terminados y materias primas en una industria de alimentos deshidratados.

María de los Ángeles Paniagua González

Química Bióloga

Guatemala, Agosto de 2016

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or religious figure, standing on a pedestal. Above the figure is a crown or tiara. The seal is surrounded by Latin text: "CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CETERA SCIENTIIS CONSPICUA".

Verificación del método Simplate[®] Total Plate Count Color Indicator (TPC CI), comparado con el método estándar de recuento en placa por vertido, para el recuento total de microorganismos aeróbicos mesófilos en productos terminados y materias primas en una industria de alimentos deshidratados.

INFORME DE TESIS

Presentado por

María de los Ángeles Paniagua González

Para optar al título de

Química Bióloga

Guatemala, Agosto de 2016

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Ruben Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza,M.A.	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

DEDICATORIA

Acto que dedico:

A Dios, por darme la vida y llenarme de amor y sabiduría para poder alcanzar esta meta.

A mi hijo Esteban Joaquín, por ser luz en mi vida, amor verdadero, mi príncipe azul.

A mi madre Mercedes González, por ser mi mayor ejemplo de lucha, constancia y perseverancia, por su dedicación y esfuerzo al hacer de mí una persona de bien.

A mi abuelita Hilda de González, por sus cuidados desde mi infancia hasta el día de hoy y por ser fuente de sabiduría en mi vida.

A mi familia, por todo su apoyo y cariño incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por ser mi casa de estudios y el lugar donde logre alcanzar mi meta.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por ser mi segundo hogar y por haberme formado profesionalmente.

A los Catedráticos, por haberme transmitido sus conocimientos y ser parte de mi formación académica.

A mi Asesora Licda. Anita Rodas de García, por su asesoría en esta investigación y por todo su tiempo y apoyo brindado.

A mis revisoras Dra. Karin Herrera y Licda. María del Carme Bran, por brindarme su tiempo y darme la orientación necesaria para perfeccionar mi tesis.

A mis compañeros de universidad, por todos los momentos compartidos.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente me apoyaron a lo largo de mi carrera.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	4
Deshidratación de alimentos	5
Microorganismos en alimentos	11
Métodos para análisis microbiológico de alimentos	15
Recuento de aerobios mesófilos estándar en placa	17
Estudios comparativos de diferentes métodos para el microorganismos patógenos en alimentos	conteo de 22
JUSTIFICACION	26
OBJETIVOS	27
HIPOTESIS	28
MATERIALES Y METODOS	29
RESULTADOS	39
DISCUSION DE RESULTADOS	46
CONCLUSIONES	49
RECOMENDACIONES	50
REFERENCIAS	51
XIII. ANEXOS	57

I. RESUMEN

El presente estudio consistió en verificar el método SimPlate[®] Total Plate Count Color Indicator (TPC CI), comparándolo con el método convencional de vertido en placa, para utilizarse en el análisis de microorganismos aerobios mesófilos en materias primas y productos terminados en las industrias de alimentos deshidratados.

El estudio fue experimental pareado y el universo de trabajo estuvo formado por 31 productos alimenticios deshidratados, de origen animal y vegetal, y 31 materias primas, procesadas y no procesadas utilizadas para la elaboración de productos deshidratados, en una industria de alimentos deshidratados. Las muestras se analizaron simultáneamente por ambos métodos, se analizó cada muestra cinco veces por cada método, con base a las normas AOAC 966.23; FDA/BAM capítulo 3 para recuento aeróbico en placa; y norma AOAC 2002.07 para método SimPlate[®] Recuento Total - Indicador de Color (TPC -CI). Una vez obtenidos los resultados de los recuentos de ambos métodos se procedió a realizar el análisis estadístico en el cual se determinó el límite de detección, repetibilidad, reproducibilidad, sensibilidad, especificidad y concordancia.

Los resultados mostraron que el método SimPlate[®] Total Plate Count Color Indicator (TPC CI), tiene una sensibilidad y especificidad del 100% , en el recuento de materia prima, y una sensibilidad del 99.3% y especificidad del 100%, en el recuento de producto terminado. Se efectuó la prueba t de student pareada, que reveló que no existe diferencia significativa entre ambos métodos ($p=0.903$). Así mismo, para evaluar la concordancia del método, se calculó el coeficiente de correlación intraclase con un valor de 0.792, el que se interpreta como buena concordancia entre ambos métodos; y un índice Kappa de 0.9146 (IC95 % de 0.797 a 1), que corresponden al método experimental (SimPlate[®] Total Plate Count Color Indicator) con relación al método de referencia (Recuento en placa).

Con los resultados obtenidos se puede concluir que el método SimPlate[®] Total Plate Count Color Indicator (TPC CI), norma AOAC 2002.07, es comparable con el método estándar de recuento en placa por vertido, para la determinación de microorganismos aerobios mesófilos totales, con sensibilidad y especificidad aceptables.

Aunque con estos productos de tipo deshidratado se obtuvieron resultados aceptables, se recomienda realizar otros estudios de evaluación del método SimPlate[®] TPC CI, en productos terminados y materias primas, cuyo ingrediente base sea el tomate, ajo o cebolla, para determinar de qué forma afecta la acidez de estos productos, en el potencial redox de la resazurina. Así como también la evaluación en otro tipo de matrices como lácteos, productos congelados y otros.

II. INTRODUCCION

Cada día los consumidores son más exigentes al momento de adquirir o comprar un nuevo producto, cambian de marca cuando las características del mismo no están innovándose diariamente al ritmo que sus deseos y necesidades lo exigen. Cada vez más, muestran una mayor conciencia por su salud a la hora de seleccionar sus alimentos, aumentando el interés por consumir alimentos saludables, sin colesterol, bajos en grasa y sodio, con altos niveles de vitaminas, minerales y fibras. Esta tendencia se ha visto reforzada por las recomendaciones realizadas por diferentes organismos de gran impacto social, como la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La industria alimentaria tiene la difícil labor de desarrollar proyectos de investigación y desarrollo de nuevos productos que beneficien al consumidor. Los productos deshidratados para uso instantáneo que puedan almacenarse por largos períodos de tiempo y mantener los atributos sensoriales propios del alimento, es uno de esos retos. Estas industrias buscan estandarizar la calidad de sus productos, para lo cual es fundamental el control microbiológico sobre la materia prima, productos intermediarios y productos terminados (Pascual, 1989).

Los controles microbiológicos que se realizan, son inspecciones que permiten en forma certera valorar microbiológicamente la calidad del producto o insumo que se desea producir o utilizar para la cadena de producción. La rapidez con la que se realicen estas determinaciones influye en la productividad y tiempo de disponibilidad del producto terminado en el mercado, lo que requiere resultados en períodos de tiempo más cortos, para establecer un panorama de calidad microbiológica de manera temprana (Harrigan & McCane, 1979).

Los métodos microbiológicos convencionales, empleados actualmente en numerosos laboratorios y establecidos en muchos casos como métodos estándares de análisis microbiológico de los alimentos, se caracterizan por ser laboriosos, ocupar bastante espacio, emplear grandes volúmenes de medios de cultivo y requerir un tiempo considerable para la obtención y el análisis de los resultados. Por el contrario, los métodos rápidos, precisan un tiempo reducido para la obtención de los resultados, permiten procesar

un número elevado de muestras por unidad de tiempo y son en general, fáciles de usar, precisos y económicamente rentables, aunque en un inicio puedan requerir una inversión económica considerable (U.S. Food and Drug Administration, 1998; Holdsworth, 1988).

El método SimPlate^{®1} Total Plate Count Color Indicator (TPC CI) es un método rápido, normado por la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC por sus siglas en inglés), utilizado para la detección y cuantificación de bacterias aeróbicas totales. La mezcla del medio y la muestra es transferida a la placa SimPlate e incubada. El medio cambia de color con la presencia de microorganismos aeróbicos (AOAC, 2005). Se emplean placas que contienen 84 pozos, en donde se inocula la muestra correspondiente al alimento, que ha sido procesado con el caldo de dilución adecuado, y luego se incuba por 24h a 35°C.

La cantidad de microorganismos es determinada por el número de pozos que muestran un resultado positivo. Este número de pozos se busca en la tabla proporcionada por el fabricante del método (Ramazzotti, Tavolaro, Destro, Landgraf & Franco, 2005; Nero et. al., 2002), y se interpreta como Número Más Probable (MPN por sus siglas en inglés).

El objetivo de este estudio es verificar el método SimPlate[®] Total Plate Count Color Indicator (TPC CI), aceptado por AOAC, comparándolo con el método estándar de Recuento en placa por vertido, para microorganismos aeróbicos mesófilos, Método BAM capítulo 3, utilizando productos alimenticios terminados y materias primas deshidratadas.

La verificación de este método, permitirá implementarlo en empresas guatemaltecas que elaboran alimentos deshidratados, logrando optimizar los procesos y disminuir el tiempo que se requiere para el análisis de las muestras, asegurando la confiabilidad en los resultados, los cuales serán obtenidos en un tiempo mínimo, lo que implica reducción de costos y tiempo de liberación de los productos terminados.

¹ SimPlate[®] es una marca registrada de BioControl Systems, Inc., usada por IDEXX bajo licencia de BioControl Systems, Inc. Protegida por las patentes norteamericanas número 5,700,655; 5,985,594.

III. ANTECEDENTES

Los primeros métodos de análisis microbiológico comenzaron a ser utilizados por microbiólogos clínicos en la década de 1960, continuando su desarrollo en décadas sucesivas hasta llegar al momento actual. Su aplicación al análisis de los alimentos comenzó unos 10 años después de que lo hiciera en el ámbito clínico y aunque su expansión inicialmente fue más lenta, en los últimos años las innovaciones han sido espectaculares. Cronológicamente, a la etapa comprendida entre 1965 y 1975 correspondió el desarrollo de los sistemas de miniaturización de las técnicas microbiológicas convencionales y la aparición de los primeros *kits* diagnósticos. De 1975 a 1985, las técnicas inmunológicas se desarrollaron rápidamente y en el periodo que abarca de 1985 a 1995 irrumpieron las técnicas genéticas y en especial la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cuya aplicación marcó un punto de inflexión importante en el análisis microbiológico, tanto de muestras clínicas como de alimentos (U.S. Food and Drug Administration, 1998).

En el inicio del siglo XXI, la contaminación microbiana de los alimentos sigue constituyendo uno de los principales problemas asociados a su consumo. Los alimentos pueden transmitir diversos microorganismos y metabolitos microbianos, algunos de ellos patógenos para el hombre.

Además del control en los alimentos de la presencia de microorganismos patógenos, la comercialización de alimentos exentos de alteraciones constituye también una de las principales preocupaciones de las industrias alimentarias. Se considera que la principal causa de alteración de los alimentos se debe a la proliferación en ellos de bacterias, levaduras y mohos. La alteración generalmente se manifiesta por la aparición de olores y sabores anómalos, defectos en el color, apariencia y textura, y otras características que hacen que el alimento sea inaceptable para su consumo. Aunque no se dispone de datos precisos, se estima que más del 25% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden debido a la acción alterativa de los microorganismos (Holdsworth, 1988).

A. Deshidratación de alimentos

Según Holdsworth (1998), la conservación de alimentos puede definirse como todo método de tratamiento de los mismos que prolonga su duración, de forma que mantengan en grado aceptable su calidad, incluyendo color, textura y aroma (Holdsworth,1998).

Los alimentos pueden conservarse adecuadamente mediante métodos muy diversos; con los que se pretende disminuir la alteración de los mismos, así como el riesgo de que sean vehículo de toxiinfecciones alimenticias. La conservación adecuada de los alimentos tiene como objetivo principal prolongar la vida útil de éstos, sin que se vean alterados los parámetros de calidad, tanto los referentes a las propiedades sensoriales como los microbiológicos (Fundación para la innovación tecnológica agropecuaria, 2003).

Desde tiempos inmemoriales, el hombre ha empleado como método de conservación de alimentos, la desecación o deshidratación, utilizando la exposición al aire y al sol. Hoy en día se siguen todavía estos métodos de forma casera, aunque la calidad obtenida deja mucho que desear en comparación con las técnicas que se usan actualmente para desecaciones, sobre todo en cuanto al sabor y color del alimento una vez rehidratado (Ruiz, 2004).

El departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés) define producto deshidratado como el que no contiene más del 2.5% de agua (base seca), mientras que el alimento seco es todo aquel producto alimenticio que ha sido expuesto a un proceso de eliminación de agua y que contiene más del 2.5% de agua (base seca) (Hernández, 2008).

Se entiende por deshidratación la eliminación de la humedad por medios artificiales, y en algunos casos, en combinación con el secado al sol (Codex Alimentarius, 1971).

En general la deshidratación o secado se refiere a la eliminación de la cantidad de agua relativa (a_w) del material en proceso. El agua casi siempre es eliminada en forma de vapor con aire bajo condiciones de temperatura controladas (González, 2007). Lo que se busca con esta tecnología, es disminuir al máximo la actividad bioquímica interna y la acción de

microorganismos que permitan mantener por mucho más tiempo el producto en condiciones de almacenaje (Águila & Romero, 2000).

1. La calidad en los alimentos deshidratados

La calidad, en términos generales, es un concepto abstracto, de difícil definición, donde el consumidor se constituye en el principal elemento para su evaluación. Para el consumidor, algunos de los atributos fundamentales de la calidad de cualquier alimento son la ausencia de defectos, la textura, el aroma, el valor nutritivo, el aspecto, que incluye tamaño, color y forma (Jarén, 2005).

Al deshidratar los alimentos, se producen cambios físicos y químicos que influyen en la calidad final, por lo que la producción de cualquier alimento deshidratado no sólo pasa por optimizar la operación en sí, en términos de volumen de producción o coste, sino que además es requisito fundamental ofrecer productos que satisfagan las necesidades y requerimientos del consumidor. El interés por mejorar la calidad de este tipo de productos, especialmente de frutas y vegetales secos, conduce a diseñar procesos que tiendan no sólo a mejorar la estabilidad durante el almacenamiento, sino también a procurar conservar sus propiedades sensoriales lo más parecidas a las del alimento fresco (Contreras, 2006).

1.1 Importancia del color en los alimentos

El color es una característica de gran importancia en la valoración física y de la calidad de los alimentos. Desde el momento en que la conservación y elaboración de los alimentos comenzó a desplazarse desde los hogares a las fábricas, existió el deseo de mantener el color de los alimentos procesados y conservados lo más parecido al de la materia prima de origen (Gilabert, 2006).

En el caso de las frutas y vegetales el color depende de la presencia de cuatro tipos fundamentales de pigmentos, carotenoides, antocianinas, clorofilas y compuestos fenólicos, los cuales pueden cambiar durante el procesado y almacenamiento.

Por otra parte, en ciertos alimentos la aparición de coloraciones marrones, frecuentemente no aceptados, se asocia a reacciones de pardeamiento no enzimático

(reacción de Maillard, propiciada por las altas temperaturas), pardeamiento de tipo enzimático y el producido por la caramelización de los azúcares, en la superficie del alimento. Todo esto puede afectar en forma negativa a la presentación y al sabor de los productos (Guerrero & Núñez, 1991).

Cuando el deterioro del color es visualmente extenso el producto resulta inaceptable, por lo que industrialmente, el color puede ser una característica determinante para el éxito comercial de innumerables productos. Debido a ello se vuelve cada día más imprescindible su control, lo que supone poder medir y comparar el color. En este sentido, es necesario disponer de métodos objetivos de medida de esta propiedad que permitan la obtención de valores comparables y reproducibles (Gilabert, 2006; Guerrero & Núñez, 1991).

La medición del color se ve afectada por muchos factores tales como la iluminación, el observador, la naturaleza y características de la propia superficie (tamaño de la muestra, su textura y brillo). Además el color es un fenómeno de interpretación subjetivo dependiente del observador, siendo más difícil su medida que la de un fenómeno objetivo como es medir una masa (Gilabert, 2006).

1.2 La textura en los alimentos

Uno de los objetivos de la industria alimentaria es producir alimentos que sean agradables y fáciles de comer. El placer es derivado de los sentidos del gusto, del olfato y de la visión. Sin embargo, la percepción de la textura también produce placer y es la sensación más relevante relacionada con la estructura del alimento. La textura se define como “todos los atributos mecánicos, geométricos y superficiales de un producto perceptibles por medio de receptores mecánicos, táctiles y, si es apropiado, visuales y auditivos” (Rosenthal, 2001).

Evidentemente, como se desprende de la definición anterior, la textura de los alimentos es esencialmente una experiencia humana que surge de nuestra interacción con el alimento y su estructura y con el comportamiento cuando es manipulado o consumido. Nuestra percepción de la textura a menudo constituye un criterio por el cual juzgamos su calidad y frecuentemente es un factor importante para seleccionar un artículo o rechazarlo. Por este

motivo, es necesario recurrir a métodos objetivos que permitan su medida. No obstante, dada la complejidad de percepciones que conforman la textura, únicamente es posible evaluar de forma objetiva alguna o algunas de las propiedades texturales, que deberán ser aquellas que estén más directamente relacionadas con la textura percibida del producto. En este sentido, en los últimos años se han realizado grandes avances en el desarrollo de técnicas microscópicas para el estudio de estructuras vegetales, en la evolución de nuevos métodos instrumentales de la medición de la textura y en métodos de análisis sensorial. El desafío persiste en encontrar la convergencia entre estas tres áreas (Contreras, 2006).

La textura de los tejidos vegetales tiene su base en la estructura celular, de manera que existe un efecto combinado de la presión de turgencia de los componentes celulares y de la elasticidad de las paredes celulares lo que determina las propiedades viscoelásticas de los tejidos vegetales. Estas propiedades están también afectadas por la composición de la fracción péctica de la pared celular y especialmente por la fuerza de las uniones celulares a través de la lámina media y el grado de empaquetamiento celular. La fuerza de las uniones celulares y el nivel de turgencia son determinantes de su comportamiento mecánico (Chiralt et al., 2001).

Los métodos de procesado de alimentos destruyen la integridad del plasmalema y la capacidad de la célula para mantener su turgencia. El procesado del alimento por calor también dará como resultado cambios en la pared celular, particularmente en la lámina media (el inicio de la rotura de la pectina conduce a la separación celular), así como otros cambios dependientes de la composición del producto como puede ser la gelatinización del almidón en el caso de que esté presente. En particular, en procesos de secado, la pérdida de agua y la exposición a altas temperaturas durante el proceso provocan el encogimiento celular y por consiguiente cambios en la textura de los productos obtenidos. Por lo tanto, la textura final depende de la importancia relativa de cada factor que contribuye a su textura y al grado con que ese factor se ha cambiado mediante el método de procesado utilizado (Rosenthal, 2001).

1.3 Cambios en el volumen de los alimentos debidos a la deshidratación

La transferencia de masa en los procesos de deshidratación de tejidos celulares supone una gran reducción del volumen de la muestra debido a la pérdida de agua del protoplasto. Como consecuencia, las células se deforman dando lugar a formas irregulares. Este proceso puede almacenar energía dependiendo de las propiedades viscoelásticas de las paredes celulares y de las zonas de unión. La pérdida de volumen total durante el proceso de secado puede explicarse teniendo en cuenta la pérdida parcial de volumen de cada una de las fases que constituyen el volumen total de la muestra (la fase líquida, la fase gas ocluida en los poros y la fase sólida insoluble). La variación en el volumen de la fase líquida es el resultado de la pérdida de agua y de la consiguiente concentración de solutos. La diferencia entre la variación de volumen total y las variaciones de volumen de la fase líquida y de la fase sólida insoluble se corresponderá a la variación de volumen de la fase gas (que se comprime o expande). La magnitud del volumen de gas perdido establece la porosidad del material. Los materiales que se encogen excesivamente revelan una reducción significativa del número de poros y del tamaño de los mismos. Sin embargo, los materiales que forman una capa externa rígida se deforman más difícilmente durante el secado (Chiralt et al., 2001; Bilbao, 2002).

Si el producto deshidratado se sumerge posteriormente en una fase líquida, la liberación de la energía almacenada como tensión mecánica en el proceso de pérdida de volumen asociado a la deshidratación causará la relajación de la estructura del tejido y por lo tanto la recuperación, al menos parcial, de su volumen. La cinética de recuperación de volumen y el nivel de volumen recuperado están afectados en gran medida por las características particulares del tejido y por las condiciones de deshidratación (Bilbao, 2002).

2. Técnicas de deshidratación

2.1 Prensado

También llamado compresión, es una operación que tiene por finalidad separar un líquido de un sistema de dos fases sólido-líquido, comprimiendo el sistema en condiciones

que permitan al líquido fluir y salir mientras el sólido queda retenido entre las superficies compresoras (Guerrero & Núñez, 1991).

2.2 Centrifugación

Al aplicar a un material mojado una fuerza centrífuga suficientemente elevada, el líquido contenido en el material se desplaza en la dirección de la fuerza, produciendo así una separación del líquido y del sólido (Guerrero & Núñez, 1991).

2.3 Evaporación superficial

Cuando un producto se somete a la acción de una corriente de aire caliente, el líquido que contiene se evapora aumentando su contenido en el aire. Se produce así una desecación. Este es el método más utilizado, también llamado deshidratación por aire caliente (Maupoey et. al., 2001).

2.4 Osmosis

Cuando un producto se sumerge en una disolución concentrada de sal o azúcar, se produce un flujo de agua desde el interior de las células del alimento hacia la disolución más concentrada a través de una membrana semipermeable (membrana celular). Este flujo se establece a causa de una diferencia de potencial químico del agua en el alimento y en la solución que lo rodea (González, 2007).

2.5 Liofilización

En esta operación, el líquido a eliminar, previamente congelado, se separa del producto que los contiene por sublimación. De ahí que sea necesario partir del material congelado y trabajar en condiciones de vacío (Guerrero & Núñez, 1991).

2.6 Absorción

La absorción es una operación aplicada a gases, en la que uno o varios componentes de una mezcla gaseosa se disuelven en un líquido. En el caso de la desecación, el componente

que se solubiliza es el vapor que se quiere eliminar del gas en cuestión. Como ejemplo puede citarse la desecación de gases mediante ácido sulfúrico (Guerrero & Núñez, 1991).

2.7 Congelación

Cuando una sustancia que contiene un líquido se congela, esta se separa paulatinamente en forma sólida, produciendo una concentración de material, que deriva de las moléculas que contenía disueltas (Maupoey et al., 2001).

B. Microorganismos en alimentos

Al evaluar el riesgo microbiológico que un alimento puede contener, deben considerarse todos los microorganismos que pueden ser transmisibles a partir de él, entre los que se pueden incluir bacterias, virus, hongos, levaduras, algas y parásitos (Health and Consumer Protection Directorate General, 1999).

La principal fuente de alimentos para el ser humano son los vegetales y animales, los cuales se encuentran naturalmente asociados a microorganismos, por lo que los alimentos que de ellos se deriven también estarán asociados a dichos microorganismos, sin embargo su presencia en los alimentos no es necesariamente un índice de riesgo para el consumidor (Health and Consumer Protection Directorate General, 1999).

Si no se tiene control sobre la calidad de los alimentos, su consumo puede representar, en algún momento, un riesgo para la salud del consumidor, pues éste contendrá microorganismos patógenos, toxinas, metabolitos tóxicos o microorganismos capaces de deteriorar la calidad del alimento hasta un estado inaceptable. Por lo tanto, deben tenerse muy en cuenta los tipos y número de microorganismos presentes en los alimentos. La presencia de microorganismos puede ocasionar alteraciones en el producto, enfermedades, así como indicar la posibilidad de que los alimentos estén contaminados por patógenos.

A menudo, el riesgo de enfermedad alimentaria es tanto más elevado, conforme el patógeno va multiplicándose en el alimento; al contrario el riesgo será menor si el microorganismo se multiplica escasamente en el alimento (Hayes, 1993). En algunos casos el alimento solo actúa como vehículo de transmisión del organismo infeccioso. La

manipulación de un alimento durante su distribución, almacenamiento y preparación para el consumo puede provocar disminución, mantenimiento o aumento del número de microorganismos presentes, en donde las toxinas más lábiles se desactivan y las más resistentes se mantienen (International Commission on Microbiologic Specifications for Foods, 1999).

Es importante tener presente que para un alimento cocido o listo para consumir la tolerancia para determinados microorganismo es cero, mientras que para un alimento crudo sí se puede permitir la presencia del mismo (dentro de ciertos niveles) si éste fuera sometido a un tratamiento previo a su consumo. En este mismo sentido, la interpretación del resultado es diferente según se trate de producto crudo o producto cocido o listo para consumir (International Commission on Microbiologica Specifications for Foods, 1999).

Un criterio microbiológico para alimentos define la aceptabilidad de un proceso, producto o lote de alimentos basándose en la ausencia o presencia o el número de microorganismos y/o la investigación de sus toxinas por unidad de masa, volumen o área. Entre los microorganismos que son aceptables dentro de un criterio microbiológico se pueden distinguir dos tipos:

1. Microorganismos indicadores de higiene

Para la evaluación de la inocuidad microbiológica de los alimentos, se utilizan organismos indicadores que se aplican a través de técnicas que permiten evaluar la calidad de la materia prima, problemas de almacenamiento, abuso de temperatura, vida útil (recuento de microorganismos aerobios mesófilos), potencial contaminación fecal o posible presencia de patógenos (*Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, Coliformes fecales), contaminación por manipulación humana (*Staphylococcus* coagulasa positiva), contaminación post tratamiento térmico (*Enterobacteriaceae*, coliformes, *Staphylococcus* coagulasa positiva, estreptococos fecales) o productos metabólicos de patógenos que indican un peligro para la salud (termonucleasa). Los microorganismos mencionados anteriormente son indicadores que revelan las condiciones a las que ha sido expuesto el producto y el peligro que pudieran representar en algún momento (Health and Consumer Protection Directorate General, 1999).

2. Microorganismos patógenos

Son aquellos microorganismos que pueden encontrarse en los alimentos, convirtiéndolos en potencial vehículo de enfermedad para quien los consuma (Health and Consumer Protection Directorate General, 1999).

3. Microorganismos aerobios mesófilos

En este grupo se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse entre el rango de temperaturas de microorganismo mesófilos en las condiciones establecidas. En este recuento se estima la carga microbiana del alimento sin especificar tipos de microorganismos (World Health Organization, 2001).

Los términos conteo de aerobios mesófilos (AMC, Aerobic Mesophilic Count), conteo aerobio en placa (APC, Aerobic Plate Count), conteo estándar en placa (SPC, Standard Plate Count), o conteo total viable (TVC, Total Viable Count) son términos equivalentes utilizados para expresar conteos de microorganismos aerobios mesofílicos (ISO 4833:2003, 2003).

Un recuento bajo de microorganismos aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de microorganismos patógenos.

Un recuento elevado, dependiendo del origen de la muestra puede significar: deficiente manipulación durante el proceso/ recolección, la posibilidad de que existan patógenos o la posibilidad de alteración de cualidades organolépticas de la materia prima o producto terminado (ISO 4833:2003, 2003).

Se conocen cinco técnicas para investigar el número total de microorganismos (Holdsworth, 1988):

1.1 Recuento en placa (TPC) para la determinación del número de células viables.

1.2 Método del número más probable de microorganismos como cálculo estadístico del número de células viables.

1.3 Técnicas de reducción de colorantes para el cálculo del número de células viables con capacidad reductora.

1.4 Recuento microscópico directo (DMC) tanto para células viables como para las no viables.

1.5 Citometría de flujo.

Los recuentos de microorganismos viables se basan en el número de colonias que se desarrollan en placas previamente inoculadas con una cantidad conocida de muestra e incubadas en unas condiciones ambientales determinadas. En estos recuentos son susceptibles de conteo aquellos microorganismos capaces de crecer en las condiciones establecidas. Se puede conseguir una amplia gama de condiciones variando la temperatura, la atmósfera, la composición del medio y el tiempo de incubación (ICMSF, 1983; AOAC, 2005).

El control de las condiciones higiénicas se puede realizar mediante un recuento total de microorganismos aerobios mesófilos, el cual se expresa como el número de unidades formadoras de colonias por gramo o por mililitro (UFC/g o UFC/ml) (ISO 4833:2003, 2003).

El análisis de microorganismos aerobios mesófilos no representa un riesgo a la salud si se realiza con buenas prácticas de laboratorio (Speck, 2002).

De acuerdo con Downes e Ito (2001), el recuento total aerobio es una técnica general ampliamente utilizada para estimar el número de microorganismos en muestras de alimentos. El recuento total aerobio se utiliza como un indicador de la población bacteriana en las muestras y resulta útil para evaluar su calidad. El procedimiento general para realizar un recuento total aerobio incluye la preparación de la muestra, diluciones decimales, montaje de las diluciones en placas en un medio apropiado, incubación de las placas y recuento (U.S. Food and Drug Administration, 1998).

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos refleja la calidad microbiológica general de la muestra analizada. Dentro de la industria es utilizado como indicador de

higiene en materias primas, materiales procesados y no procesados, monitoreo de la eficiencia de procesos térmicos; asimismo provee un panorama general de la carga microbiana que el alimento procesado posee al final de la fabricación (Código Alimentario Argentino, 2011).

C. Métodos para análisis microbiológico de alimentos

Los métodos de laboratorio utilizados para la detección o recuento de microorganismos forman parte del criterio microbiológico. La elección del método a utilizar debe privilegiar a aquellos métodos estandarizados y de alta sensibilidad que hayan sido validados por organismos internacionales/nacionales de referencia (Speck, 2002).

En los últimos años ha habido avances significativos en el desarrollo de nuevas tecnologías para la detección y la separación de microorganismos de los alimentos. El desarrollo de técnicas moleculares (PCR) e inmunológicas (ELISA) brinda ventajas sobre los métodos tradicionales, específicamente en lo que refiere a velocidad, pero su uso todavía no se ha generalizado.

1. Microbiología convencional o tradicional

Para su aplicación puede utilizarse uno de los dos métodos con los que cuenta:

- a. Métodos basados en el desarrollo de Unidad Formadora de Colonia en medios sólidos que se fundamentan en el desarrollo de una colonia visible a partir de una unidad viable.
- b. Métodos de dilución en tubo en el que la detección de crecimiento se hace mediante turbidez, producción de ácido y/o gas (Código Alimentario Argentino, 2011).

2. Métodos alternativos

Se ha visto la necesidad de desarrollar métodos alternativos debido a: implantación de sistema de análisis de puntos críticos de control en las industrias alimenticias, utilización de planes de muestreo basados en la estadística que requieren analizar un gran número de muestras, necesidad de obtener resultados con la mayor inmediatez posible y aplicación de

las medidas correctoras necesarias con prontitud y ahorro de recursos (Código Alimentario Argentino, 2011).

Es necesario que en estos métodos se evalúen los siguientes aspectos: precisión, resolución, facilidad de uso, rápida generación de datos, aceptabilidad y validación internacional, coste analítico y amortización de la instrumentación, disponibilidad de espacio, soporte del proveedor y mantenimiento técnico y versatilidad y posibilidad de evolución (Código Alimentario Argentino, 2011).

3. Automatización de métodos convencionales

La automatización de los métodos convencionales ofrece como ventajas la reducción del uso de material y del tiempo necesario para prepararlo, así como un incremento en el número de muestras que pueden analizarse (en comparación con el método estándar en placas). Pero a su vez, esto conlleva inconvenientes como en los que se reduce significativamente el tiempo preciso de incubación de cada ensayo, no obstante, existe algunos como Petrifilm series 2000 (coliformes) y sistema TEMPO (levaduras y mohos) que proporcionan resultados en menor tiempo (Código Alimentario Argentino, 2011).

4. Métodos rápidos

Entre estos se describen los métodos de impedancia, que facilitan los resultados entre 6 a 12 horas. Se basan en la detección de la actividad metabólica en un medio de cultivo. Los cambios de impedancia se detectan cuando la concentración microbiana excede de un umbral determinado. Los sistemas de impedimetría disponibles son: Rabbit, Bactometer, Malthus 2000 y Bactrac. Existen métodos tan rápidos que proveen resultados en menos de una hora. Dentro de estos se tiene el sistema VIDAS, que es un inmunoensayo automatizado. Estas metodologías no han sido diseñadas para recuento de microorganismos indicadores de higiene (Código Alimentario Argentino, 2011).

D. Recuento de aerobios mesófilos estándar en placa

También conocido como recuento de aerobios mesófilos, es el análisis directo mayormente empleado para determinar la calidad microbiológica de la leche y otros alimentos (AOAC, 2005).

El método consiste en hacer diluciones de la muestra y sembrar en placas de Petri con agar estándar; luego de 24 a 48 horas de incubación a $37 \pm$ se cuentan las colonias observadas las cuales permiten obtener el número de unidades formadoras de colonias por mililitro o gramo de muestra (UFC/mL o UFC/g). Los resultados obtenidos siempre son inferiores a los reportados con el recuento directo, ya que aquí solo intervienen microorganismos vivos capaces de formar colonias, además una colonia puede estar originada por uno o más de una unidad formadora de colonias (FDA, 1998; AOAC, 2005).

1. Método Simplate[®] Total Plate Count Color Indicator

Se define como “método rápido” a cualquier método destinado a la detección, el recuento, la caracterización y la subtipificación de microorganismos (patógenos y del deterioro) mediante el cual se obtienen resultados de manera sencilla, fiable y en menor tiempo que con los métodos convencionales. El desarrollo de métodos rápidos y automatizados constituye un área de la microbiología aplicada muy dinámica y en continua evolución. En las últimas cuatro décadas hubo numerosos avances en el desarrollo de métodos rápidos y desde hace 15 años este campo cobró gran importancia en investigación y en la industria alimentaria (Nero et. al., 2002).

El método SimPlate[®] Total Plate Count Color Indicator (TPC CI) es un método rápido, normado por la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC por sus siglas en inglés), método oficial **2002.07**, para sobrepasar las limitaciones que se enfrentan con el resto de los métodos de conteo. Este método pretende brindar resultados en menos tiempo para obtener beneficios, como por ejemplo, liberar productos más rápido, entre otros. También ofrece realizar menor cantidad de diluciones, ya que posee un rango máximo de conteo de 738 UFC/g, mientras que el método estándar en placa y otros métodos de conteo están limitados a un rango máximo de 300 UFC/g o menos (AOAC, 2005).

El método Simplate[®] TPC CI es usado para la detección y cuantificación de bacterias aeróbicas totales. La mezcla del medio y la muestra es transferida a la placa Simplate e incubada. El medio cambia de color con la presencia de microorganismos aeróbicos.

El método SimPlate[®] TPC CI, desarrollado por IDEXX Lab. Inc., USA, y actualmente distribuido por BioControl Systems Inc., USA (Nero et. al., 2002), emplea placas que contienen 84 pozos donde el alimento es sembrado con el medio de cultivo y luego incubado por 24h a 35°C. La cantidad de microorganismos es determinada por el número de pozos que muestran un resultado positivo. Este número corresponde al Numero Más Probable (MPN por sus siglas en ingles), que se determina por la tabla proporcionada por el fabricante (Ramazzotti, Tavolaro, Destro, Landgraf & Franco, 2005; Nero et. al., 2002).

El método SimPlate[®] TPC CI es una versión nueva de las placas SimPlate[®] TPC, las cuales se basaban en tecnología enzimática múltiple (Townsend & Naqui, 1998). El medio de cultivo contiene varios sustratos que cuando se metabolizan liberan una sustancia fluorescente (Beuchat et. al., 1998). El método SimPlate[®] TPC CI, cuantifica los microorganismos aerobios mesófilos en comida usando resarzurina como indicador de crecimiento. La multiplicación de microorganismos altera el potencial redox del medio, resultando en un cambio del color inicial azul a rosado, debido a la formación de resofurina, o de amarillo a incoloro por la formación del compuesto dihidro-resorufina. Como el medio TPC CI no se basa en la reacción enzimática de microorganismos, no sufren la interferencia de las enzimas presentes en los alimentos (Nero et. al., 2002; Smith & Townsend, 1999).

2. Procedimiento para utilización del método SimPlate[®] TPC CI en alimentos

Como ya se mencionó, este método se basa en el empleo de una placa de plástico circular con 84 pocillos. Para el análisis de muestras con recuentos elevados, se emplean placas de 198 pocillos. La siembra se realiza en el centro de un reservorio en el que se dispensa 1 ml de la muestra de alimento convenientemente diluida y 10 ml del medio líquido rehidratado proporcionado por el fabricante. La mezcla (alimento/medio) se distribuye homogéneamente en los pocillos mediante movimientos circulares de la placa.

Después de 24 horas de incubación a 35 °C, la placa se sitúa bajo una fuente de luz ultravioleta. Los pocillos que presentan fluorescencia se consideran positivos. El número de pocillos positivos se convierte en valores del NMP gracias a la utilización de tablas de conversión (Beuchat et. al., 1998).

3. Características y ventajas del método SimPlate® TPC CI para su uso en industrias de alimentos (Townsend & Naqui, 1998)

- Procedimiento optimizado, AOAC, medio listo para usar.
- Mayor precisión (todas las colonias son del mismo tamaño con distribución regular en la placa).
- Con una placa se pueden leer hasta 738 UFC sin necesidad de dilución previa.
- No hay interferencia de residuos de alimentos.
- No hay interferencias de colonias “invasoras”.
- No hay lavado de placas.
- El medio de cultivo es un caldo, lo que permite mejor recuperación de microorganismos lesionados.
- Doble espacio libre en la incubadora por la retirada de la muestra en 24 horas.
- Muestras con fuerte color pueden ser analizadas por el efecto dilución del color del caldo o por el medio fluorescente.

4. Principales factores que afectan el crecimiento y recuperación de los microorganismos en alimentos

Varios factores ambientales afectan la recuperación de los microorganismos en los medios de cultivo. Se deben examinar en detalle las condiciones que se proveen a los microorganismos para su crecimiento, ya que estos pueden alterar el control del crecimiento de los mismos. Entre los principales están la temperatura de incubación, pH,

actividad de agua y tiempo de incubación, entre otros (Abbey, Heaton, Golden & Beuchat, 1988).

4.1 Temperatura

Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Si consideramos la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de cultivo, podemos observar una temperatura mínima por debajo de la cual no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que la velocidad es máxima. Por encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular. El aumento de la velocidad de crecimiento con la temperatura se debe al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura. Se denomina coeficiente de temperatura a la relación entre el incremento de la velocidad de reacción y el de temperatura. En términos generales, la velocidad de las reacciones bioquímicas suele aumentar entre 1.5 y 2.5 veces al aumentar 10°C la temperatura a la que tienen lugar (Abbey et al., 1988; Colwell & Morissetti, 1969).

La falta de crecimiento a temperaturas bajas se debe a la reducción de la velocidad de las reacciones bioquímicas y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular. Hay varios tipos de microorganismos en función de sus temperaturas de crecimiento psicrófilos, psicrótrofos, mesófilos y termófilos. Las temperaturas de incubación afectan el crecimiento de los microorganismos (Pisabarro, 2007).

4.2 Actividad de agua (a_w)

Se denomina actividad de agua a la relación entre la presión de vapor de agua del substrato de cultivo (P) y la presión de vapor de agua del agua pura (P0). El valor de la actividad de agua está relacionado con el de la humedad relativa (HR) (Jordano, 2008).

El valor de la actividad de agua nos da una idea de la cantidad de agua disponible metabólicamente. Por ejemplo, comparemos el agua pura donde todas las moléculas de agua están libremente disponibles para reacciones químicas con el agua presente en una disolución saturada de sal común (NaCl) donde una parte importante de las moléculas de agua participa en la solvatación de los iones de la sal disuelta. En este último caso, la actividad de agua mucho menor que en el primero, conforme aumenta la cantidad de solutos en el medio, disminuye su actividad de agua (Jordano, 2008).

El agua es uno de los substratos principales que permite que se lleven a cabo muchas reacciones bioquímicas (proteasas y lipasas, por ejemplo). Cuando no hay agua disponible, estas reacciones se detienen, por lo tanto el metabolismo deja de funcionar. Esta falta de agua también detiene la función de muchas de las enzimas que podrían degradar las estructuras biológicas. Por ello, las células que no crecen por falta de agua no mueren rápidamente: los sistemas de degradación tampoco funcionan y no las degradan (Abbey et al., 1988).

Es decir, cuando un microorganismo se encuentra en un substrato con actividad de agua menor que la que necesita, su crecimiento se detiene, manteniéndose en condiciones de resistencia durante un tiempo prolongado. Tiempo que se estima puede ser mucho mayor en el caso de las esporas, en donde la fase de resistencia puede ser considerada prácticamente ilimitada (Abbey et al., 1988).

La gran mayoría de los microorganismos requiere valores de actividad de agua muy altos para poder crecer. Los valores mínimos de actividad para diferentes tipos de microorganismos son los siguientes: bacterias $a_w > 0.90$, levaduras $a_w > 0.85$, hongos filamentosos $a_w > 0.80$ (Nguyen & Carlin, 1994). La actividad de agua en alimentos culinarios deshidratados es < 0.65 (Nguyen & Carlin, 1994).

En función de su tolerancia a ambientes con baja a_w , los microorganismos que pueden crecer en estas condiciones se clasifican en halotolerantes, halófilos y xerófilos según toleren o requieran condiciones salinas o hipersalinas, respectivamente (Lara et al., 1976).

La reducción de la actividad de agua para limitar el crecimiento bacteriano tiene importancia aplicada en industria alimentaria. La utilización de almíbares, salmueras y salazones reduce la actividad de agua del alimento para evitar su deterioro bacteriano (Penteado & Leitao, 2004).

4.3 pH

Es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos, ya que cada tipo de microorganismo tiene un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente, fuera de este rango muere. El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de iones a ambos lados de la membrana citoplásmica (FDA, 1995; Hocking & Pitt, 1980).

El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el rango de 6.0 a 8.0. Hay microorganismos acidófilos que pueden vivir a pH=1.0 y otros alcalófilos que toleran pH=10.0. Hay que considerar que, como consecuencia del metabolismo, el pH del medio de crecimiento suele tender a bajar durante el cultivo. Por otra parte, la bajada del pH del medio que producen ciertos microorganismos les confiere una ventaja selectiva frente a otros competidores. Por todo ello es importante el detalle del pH en los medios de cultivo y de las soluciones que estén relacionadas con los microorganismos de interés (ICMSF, 1983).

E. Estudios comparativos de diferentes métodos para el conteo de microorganismos patógenos en los alimentos

Se presentan a continuación cinco estudios comparativos respecto al método de vertido en placa y otros métodos rápidos de conteo de microorganismos.

1. Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm™² 3M para el análisis de alimentos (Alonso & Poveda, 2008)

En este estudio se llevó a cabo un análisis comparativo entre seis productos para la cuantificación de microorganismos indicadores en alimentos. Los productos ensayados fueron: 3M™ placas Petrifilm™, Placas Ridacount, Medio de Cultivo Chromocult Merck, Coli ID de Biomeraux, Baird Parker de Biomeraux y el medio estándar para el método de vertido en placa. Los resultados demostraron la necesidad que existe de la utilización de los métodos de recuento rápido, ya que la mayoría de empresas utilizan métodos convencionales para realizar los análisis de identificación y recuento de microorganismos patógenos en alimentos, y sólo en situaciones de emergencia recurren a los métodos rápidos. Se propuso divulgar la información sobre los beneficios que tiene la utilización de los métodos rápidos para llevar a cabo estos análisis.

2. Evaluación de Petrifilm™ para la enumeración de bacterias aerobias en queso de cabra Crottin (de Sousa, Tamagnini, González & Budde, 2005)

Petrifilm™ Aerobic Count Plate (ACP) desarrollado por 3M™ es un sistema listo para usar, empleado para el recuento de bacterias aerobias en alimentos. Petrifilm™ fue comparado con los métodos estándar en diferentes productos alimenticios con resultados satisfactorios. Sin embargo, en alimentos fermentados, algunos estudios mostraron que el recuento de bacterias aerobias en Petrifilm™ fue significativamente menor que aquellos obtenidos con los métodos convencionales (PCA). El propósito de este estudio fue comparar el método Petrifilm™ para el recuento de bacterias aerobias con un método convencional en queso de cabra Crottin. Se usaron 30 muestras para el recuento de colonias. Las medias y desviaciones estándar fueron $7.18 \pm 1.17 \log \text{ UFC g}^{-1}$ en PCA y $7.11 \pm 1.05 \log \text{ UFC g}^{-1}$ en Petrifilm™. El análisis de varianza mostró que no había diferencia significativa entre ambos métodos

El coeficiente de correlación fue 0.971 ($P = 0,0001$) indicando una fuerte correlación lineal. Los resultados muestran a Petrifilm™ como un método apropiado y una alternativa

² Petrifilm™ es una marca registrada de 3M

conveniente a los métodos estándar para la cuantificación de flora aeróbica en queso blando de cabra.

3. Comparación de métodos convencionales y método SimPlate® para la enumeración de microorganismos aerobios, coliformes y *Escherichia coli* (Pangloli, Jackson, Richards, Mount & Draughon, 2006)

El objetivo de este estudio fue comparar el método convencional de siembra en placa con el método SimPlate® para el recuento de microorganismos aerobios, coliformes y *Escherichia coli* en muestras de animales de granja y su ambiente. Las muestras evaluadas incluyeron hisopos rectales, materia fecal, ropa de cama, camas, alimentos para animales y el suelo de las granjas de ganado vacuno, porcino y granjas avícolas. Se comparó el método estándar de vertido en placa y el método convencional de agar bilis rojo violeta con 4-metil β -D-glucurónido con el método SimPlate TPC CI para el recuento de microorganismos aerobios y el método SimPlate para Coliformes y *E. coli* CI para el recuento de coliformes totales y *E. coli*, respectivamente. En general, el método SimPlate dio como resultado, recuentos que no fueron significativamente diferentes ($P > 0.05$) de aquellos recuentos que se realizaron con los métodos convencionales. Los recuentos de población con el método SimPlate están altamente correlacionados con el recuento de unidades formadoras de colonias de los métodos convencionales, con $r = 0.90$, 0.94 y 0.94 para los recuentos de microorganismos aerobios, coliformes totales, *E. coli*, respectivamente. Por lo tanto, los datos de este estudio indican que el método SimPlate son comparables y fiables para la enumeración de microorganismos aerobios, coliformes y *E. coli* en muestras de granja ambientales agrícolas.

4. Evaluación interlaboratorios del método conteo en placa heterotrófico SimPlate comparado con el método estándar de conteo de vertido en placa en agua (Jackson *et al.*, 2000)

En este estudio se realizó una evaluación interlaboratorios del método Simplate HPC (Heterotrophic plate count) comparado con el método estándar de conteo de vertido en placa. En dicho estudio, participaron seis laboratorios evaluando un total de 632 muestras de agua. Las muestras consistieron en aguas potables cloradas (neutralizado con tiosulfato

de sodio), aguas de pozo no tratadas, aguas naturales (lagos y ríos) y efluentes secundarios clorados de aguas residuales (neutralizado con tiosulfato de sodio). Las muestras, en ambos métodos, se incubaron a 35°C por 48. Ambos métodos se analizaron por regresión lineal, para su comparación, encontrando que el método SimPlate HPC fue equivalente con el método estándar de vertido en placa ($r = 0.95$). Todo esto sugiere fuertemente que el método SimPlate HPC produce resultados equivalentes a los del método estándar de HPC, indicando la idoneidad del método SimPlate como un método alternativo para HPC en agua.

5. Recuento total de microorganismos aerobios en alimentos por el método Simplate® Total Plate Count Color Indicator (TPC CI) y los métodos de cultivo convencionales: estudio en colaboración (Feldsine, P., Leung, S., Lienau, A., Mui, L. & Townsend, D., 2003)

En este estudio de colaboración internacional, el método Simplate® Total Plate Count Color Indicator (TPC CI) se comparó con el método de vertido en placa AOAC (966.23) y con el método ISO (ISO 4833) para el recuento de microorganismos aerobios totales. Los métodos de la AOAC y la ISO utilizan el mismo medio de crecimiento; sin embargo, se diferencian en los diluyentes utilizados, la temperatura de incubación de la prueba, y la duración de la incubación. El método AOAC incuba las placas a 35 ° C durante 48 h, mientras que el método ISO incuba las placas a 30 ° C durante 72 h. Debido a estas diferencias entre los dos métodos de referencia, se estableció un conjunto adicional de SimPlate de acuerdo a las normas ISO, para un total de 4 métodos. Seis tipos de alimentos fueron evaluados por los 4 métodos en este estudio. Tres porciones de ensayo fueron contaminados naturalmente probados para cada tipo de alimento, para un total de 18 lotes de alimentos analizados. Se contó con la participación de 19 laboratorios a nivel de Estados Unidos y Europa. En general, hubo una diferencia <0.3 en la media del logaritmo del recuento de microorganismos aerobios por el método SimPlate y sus correspondientes métodos de referencia.

IV. JUSTIFICACION

La inocuidad de los alimentos, se demuestra mediante el cumplimiento de las normas nacionales, como es COGUANOR (*Comisión Guatemalteca de Normas*) e internacionales, en caso de exportación de estos productos, FDA (*Food and Drug Administration*), *Reglamento Técnico Centroamerica (RTCA)*.

Para determinar la inocuidad, debe realizarse análisis microbiológicos confiables, realizados a la materia prima y producto terminado utilizando métodos de análisis, tal como el método microbiológico estándar de recuento en placa por vertido, normado por la *Association of Official Analytical Chemists (AOAC* por sus siglas en inglés) y por la *American Public Health Association (APHA* por sus siglas en inglés).

Estos métodos microbiológicos convencionales, a pesar de ser internacionalmente reconocidos, se caracterizan porque son laboriosos, requieren bastante espacio, emplean grandes volúmenes de medios de cultivo y requieren un tiempo considerable para la obtención y el análisis de los resultados. Es por esto que las industrias requieren, la utilización de métodos de análisis rápidos, que reducen el tiempo para la obtención de los resultados, analizando un número elevado de muestras por unidad de tiempo y son en general fáciles de usar, precisos y económicamente rentables.

Con este estudio se comparó el método SimPlate Total Plate Color Indicator (TPC CI) con el método convencional de vertido en placa BAM capítulo 3, para poder implementarlo en industrias de alimentos deshidratados de nuestro país, por las múltiples ventajas que representa. Con este método se pretende brindar resultados en menos tiempo para obtener beneficios, como por ejemplo, liberar productos más rápido, entre otros. También ofrece realizar menor cantidad de diluciones, ya que posee un rango máximo de conteo de 738 UFC/g, posee mayor precisión (todas las colonias son del mismo tamaño con distribución regular en la placa), no hay interferencias de colonias “invasoras” y el medio de cultivo es un caldo, lo que permite mejor recuperación de microorganismos lesionados (AOAC, 2005; Townsend & Naqui, 1998).

V. OBJETIVOS

A. GENERAL

Verificar el método SimPlate[®] Total Plate Count Color Indicator (TPC CI), comparándolo con el método convencional de vertido en placa, para utilizarse en el análisis de microorganismos aerobios mesófilos en materias primas y productos terminados en las industrias de alimentos deshidratados.

B. ESPECÍFICOS

1. Comparar la recuperación de microorganismos mesófilos, presentes en la materia prima y productos deshidratados procesados, utilizando el método SimPlate[®] Total Plate Count Color Indicator (TPC CI) contra el método vertido en placa referido por BAM.
2. Determinar sensibilidad, especificidad, el límite de detección, la repetibilidad y la reproducibilidad, y la concordancia por medio del coeficiente correlación intraclase, del método SimPlate[®] Total Plate Count Color Indicator (TPC CI), mediante el análisis microbiológico de los productos terminados y materia prima de alimentos deshidratados.

VI. HIPOTESIS

El método SimPlate[®] Total Plate Count Color Indicator (TPC CI) es comparable con el método estándar de recuento en placa por vertido, para la determinación de el recuento total de microorganismos aerobios mesófilos, con sensibilidad y especificidad aceptables.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

1. Universo: Alimentos deshidratados
2. Muestra para validación: Para evaluar la reproducibilidad y la repetibilidad se utilizaran 12 muestras de producto terminado. (Anexo 1, Tabla 1)
3. Muestra: 31 materias primas y 31 productos terminados de la industria de alimentos deshidratados (Anexo 1, Tabla 2 y tabla 3)

B. Recursos

1. Recursos humanos

1.1 Tesista: Br. María de los Ángeles Paniagua González

1.2 Asesor: Licda. Ana Rodas de García

2. Recursos Institucionales

Laboratorio de microbiología de la industria de alimentos deshidratados instantáneos

C. Materiales

1. Equipos

1.1 Baño María a $46 \pm 1^\circ \text{C}$

1.2 Incubadora a 37°C

1.3 Estufa

1.4 Microondas

1.5 Instrumento triturador de alimentos (Stomacher)

1.6 Instrumento de medición de pH (pHmetro)

- 1.7 Pipeteador 100-1000 μL
- 1.8 Termómetros calibrados
- 1.9 Termómetros de máximos y mínimos para autoclave

2. Reactivos

- 2.1 Agar para recuento en placa (PCA, Plate Count Agar)
- 2.2 Medio SimPlate[®] TPC-CI
- 2.3 2,3,5-trifeniltetrazolium.
- 2.4 Suplemento A SimPlate[®] TPC-CI
- 2.5 Solución pH 4
- 2.6 Solución pH 7
- 2.7 Peptona de caseína
- 2.8 Cloruro de sodio
- 2.9 NaOH 1N
- 2.10 HCl 1N
- 2.11 Caldo BHI

3. Instrumentos

- 3.1 Picheles de acero inoxidable
- 3.2 Cucharas estériles
- 3.3 Tips
- 3.4 Cajas de petri plásticas de 15 x 100 mm

3.5 Pipetas automáticas de volúmenes variables

3.6 Placas SimPlate TPC CI

4. Cristalería

4.1 Pipetas de 2 mL

4.2 Pipetas de 10mL

4.3 Beacker 25 mL

4.4 Botellas de vidrio 1000 mL

4.5 Botellas de vidrio 100 mL

4.6 Tubos pirex

D. Métodos

La metodología a utilizar se basó en las normas **AOAC 966.23**; FDA/BAM capítulo 3 para recuento aeróbico en placa; y norma **AOAC 2002.07** para método SimPlate[®] Recuento Total - Indicador de Color (TPC -CI).

1. Procedimiento de análisis de microorganismos aerobios mesófilos por el método vertido en placa (Anexo 2)

a. Elaboración del medio de cultivo (Anexo 3)

b. Rotulación

- Ordenar muestras: productos terminados, productos intermediarios y materias primas, para evitar arrastre, de la muestra con menor carga bacteriana a la muestra con mayor carga bacteriana.
- Numerar adecuadamente las muestras, correlacionando lo indicado en la etiqueta con la descripción de la solicitud de análisis.

- Rotular con fecha y hora de siembra, medio de cultivo, número de muestra, y dilución de la misma en las cajas de petri.

c. Pesaje y homogenización

- Realizar calibración interna y externa de la balanza
- Encender mechero
- Pesar 10 gramos de alimento directamente en la botella con 90 mL de diluyente si es pulverulento o en bolsa estéril si es necesario triturarlo para su homogenización.
- Homogenizar por inversión la botella o colocar dentro del Stomacher la bolsa de 1 a 2 minutos para homogenizar completamente el alimento.

d. Siembra

- Homogenizar de nuevo la muestra manualmente.
- Tomar 1 ml de la muestra (1:10) a sembrar entre los 15 -30 minutos después de pesada para evitar proliferación bacteriana.
- Colocar en un tubo con 9 ml de diluyente y homogeneizar en vortex, (dilución 1:100).
- Colocar en un segundo tubo con 9 mL de diluyente 1 ml de la dilución (1:100) para realizar la dilución 1:1000.
- Colocar 1 ml en la caja de petri rotulada.
- Verter 10 ml de PCA a 45° C.
- Homogenizar la muestra con el agar mezclando en forma circular realizando movimientos circulares hacia la derecha e izquierda y movimientos rectos hacia arriba y hacia abajo en el lugar en el que se dejará la placa.

- Esperar a que solidifique.
- Verter 5- 10 ml en una segunda capa, para evitar colonias esparcidas.
- Dejar solidificar.

e. Incubación

- Colocar placas en incubadora a 37° C.
- Apilar no más de 6 cajas para que la temperatura sea homogénea.

f. Lectura

- Leer en las primeras 24 horas de incubación con ayuda de la cámara de Quebec y si se considera necesario del estereoscopio.
- Marcar con marcador indeleble las colonias contadas.
- Realizar una segunda lectura a las 48 horas de incubación y marcar de color diferente las nuevas colonias contadas.
- Llevar registro de las colonias contadas en la primera lectura y en la segunda lectura.

g. Cálculo e informe de resultados (Anexo 4)

2. Procedimiento de análisis de microorganismos aerobios mesófilos por el método SimPlate® TPC CI (Anexo 5 , 6 y 7)

3. Evaluación de la confiabilidad y el desempeño de la prueba SimPlate® TPC CI

Para determinar el límite de detección se preparó con la cepa de *Escherichia coli* ATCC 11775 una solución concentrada de *Escherichia coli* suspendiendo una asada del cultivo puro de la cepa en un tubo con 9 ml de caldo BHI, se incubó por 24 horas a 35°C, se prepararon diluciones partiendo del tubo concentrado, se tomó 1 ml de éste y se agregó a otro tubo con 9ml de BHI, se vortexeo por 15 segundos, se tomó 1ml del segundo tubo y se

agregó a otro tubo con BHI, se repitió el mismo procedimiento hasta llegar a la dilución 10^9 . Se cuantificó el número de microorganismo presente en todas las diluciones, sembrando 1ml de cada una de estas en cajas de petri (se hizo por duplicado), se agregó 20 ml de medio PCA, se homogenizó y se dejó que solidifique, se incubó a 35° por 48 horas. Pasado el tiempo de incubación, se realizó el conteo de las colonias utilizando para ello una cámara cuenta colonias.

Se seleccionó dos diluciones anteriores a la que presentó crecimiento nulo y se tomó 1 ml de cada una de las diluciones, se inocularon a las muestras matriz (previamente se pesó 10 gramos de cada muestra); después de haber contaminado los productos los cuales ya deben estar pesados, se sembraron la muestras siguiendo el mismo procedimiento descrito en cada uno de los métodos. Se repitió diez veces este procedimiento, para el método SimPlate® TPC CI.

Una vez determinado el límite de detección, se seleccionó la dilución que permitió la recuperación de la bacteria en las muestras matriz, se contaminaron nuevamente 6 muestras por cada analista y se realizaron 3 repeticiones del análisis bajo las mismas condiciones por una analista y 3 por otro analista. Con estas mediciones se evaluó la reproducibilidad al hacer comparaciones entre analistas y la repetibilidad al hacer comparaciones entre los datos de cada analista por separado.

E. Diseño estadístico

1. Diseño del estudio

Estudio experimental pareado. Con el fin de documentar (como lo requiere las normas ISO) que los resultados obtenidos analizando muestras con el método innovador y el convencional ofrecen la misma confiabilidad.

2. Universo de trabajo para análisis

Productos alimenticios deshidratados, de origen animal y vegetal, y materias primas, procesadas y no procesadas utilizadas para la elaboración de productos deshidratados, en una industria de alimentos deshidratados.

3. Tamaño de muestra

La muestra se clasificó en dos grupos:

- a. Productos terminados: Sopas, consomés y sazónadores.
- b. Materias primas: Especias, hortalizas y granos.

Se trabajó con:

- Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ para el cual $Z = 1.96$.
- Variabilidad esperada (Varianza = σ^2)
- $\Delta = \sigma / 2$ esto es, el límite de error (exactitud), es decir, la distancia mínima a partir de la cual se podría decir que las mediciones son diferentes.

Para fines del muestreo, se estableció una relación entre Δ y σ (desviación estándar), con el propósito de obtener una muestra estadísticamente representativa y lo más reducida posible.

Para el cálculo de la muestra se empleó la fórmula:

$$n_j = \frac{2 NC^2 \sigma^2}{\Delta^2}$$

donde, n_j = Número de pares de mediciones, $NC = Z$ y $\Delta = \sigma/2$.

$$n_j = \frac{2 NC^2 \sigma^2}{(\sigma/2)^2} \longrightarrow n_j = \frac{2 NC^2 \sigma^2}{(\sigma^2/2^2)} \longrightarrow n_j = 8 NC^2 \longrightarrow n_j = 8(1.96)^2 = \mathbf{31}$$

Es decir, 31 muestras para producto terminado y 31 muestras para materia prima, siendo la proporción de estas: 10 sopas, 10 consomés, 11 sazónadores, 10 especias, 10 hortalizas y 11 granos.

Las muestras se analizaron simultáneamente por ambos métodos, con 5 repeticiones de cada muestra.

4. Análisis estadístico

a. Descripción de los datos

Los datos fueron organizados, resumidos y presentados en tablas de frecuencias absolutas y relativas, y representados por graficas; para las variables cualitativas se calculó % y para variables cuantitativas, medias y desviaciones estándar.

b. Contraste de las medias

Se realizó el análisis estadístico por medio de la prueba de t de Student pareada para comparar la media de las diferencias de los valores determinados por cada método, con un nivel de significancia del 5%. Se realizó una transformación para que los datos se apeguen a la distribución normal y se utilizaron los logaritmos base 10 de estos valores.

c. Límite de detección

Análisis de tipo semicuantitativo se hizo por medio de diluciones progresivas de base 10. El objetivo era detectar aquella dilución en donde se obtuviera menos de 10 UFC/mL. Sin inocular en la matriz (*Escherichia coli* “pura”), se hizo 10 veces cada dilución que presente un recuento no mayor a 300 UFC/ml. Para cada dilución se planteó una prueba de hipótesis binomial en la que: H_0 (hipótesis nula): $p \leq 0.05$ indica que el evento es aleatorio o que no proporciona resultados consistentes ni significativos. H_a (hipótesis alterna): $p > 0.05$ indica que el evento no es aleatorio y los resultados son consistentes y significativos. En base a los resultados del recuento en placa de las diluciones, se detuvo en la dilución en la que los 10 ensayos dieron el mismo resultado (no crecimiento), la H_0 se rechaza a un nivel $\alpha = 0.01$.

Con la dilución encontrada y la inmediata anterior se probaron sobre las matrices producto terminado 10 réplicas para el método SimPlate[®] TPC CI. Se espera que los resultados obtenidos sean iguales a los de la primera fase (sin inocular en la matriz). El análisis para H_0 y H_a es igual al inciso anterior. El cambio del límite de detección ya en las matrices se estableció con este ensayo.

d. Repetibilidad

Se analizaron 6 muestras 3 veces, por cada uno de dos analistas, cada uno con sus propias condiciones de análisis (balanza, forma de realizar el ensayo). Las muestras se inocularon con la cepa de *Escherichia coli* ATCC 11775, agregándole 1ml de la dilución anterior al límite de detección para que se garantizara el crecimiento de la bacteria en las matrices analizadas. La respuesta esperada fue de carácter binomial (recuperación o no recuperación de la bacteria, para cada analista). El análisis se realizó con una prueba binomial, esperando la recuperación de la bacteria en las 10 repeticiones, el valor de probabilidad asociada a 6 éxitos en 6 ensayos es de 0.016, con un nivel de confianza de 99%.

e. Reproducibilidad

Se analizó utilizando la prueba de hipótesis binomial, pero comparando los resultados de las seis muestras cada analista. $H_0: p_{A1} = p_{A2} = 0.5$ y $H_a: p_{A1} \neq p_{A2}$, donde p_{A1} es igual al valor p del analista 1 y p_{A2} es igual al valor p del analista 2. Ambos resultados (dos analistas) coincidieron en el 100% de recuperación para inferir que existe reproducibilidad de los métodos.

f. Sensibilidad y Especificidad

La sensibilidad y especificidad se determinó por medio de la construcción de tablas de contingencia de 2X2 con los resultados de los recuentos de las 31 muestras de producto terminado; y los resultados de las 31 muestras de materia prima, comparando los resultados obtenidos del método SimPlate TPC CI con los que se obtuvieron con el método estándar de recuento en placa. De cada una de las 31 muestras se realizaron 5 lecturas. Los valores obtenidos por cada método se convirtieron a variable dicotómica, para realizar una adecuada evaluación estadística que incluya la misma escala de medición, haciendo uso de los siguientes límites microbiológicos:

Requisitos	n	c	m	M
Microorganismos aerobios mesófilos (UFC/g) en producto terminado	5	1	10^4	10^5
En materia prima	5	2	10^5	10^6

n = Número de muestras por examinar

m = Índice máximo permisible para identificar el nivel de buena calidad

M = Índice máximo permisible para identifica el nivel aceptable de calidad.

c = Número máximo de muestras permisibles con resultados entre m y M

Se calculó con un intervalo de confianza del 95% la sensibilidad y especificidad del método SimPlate[®] TPC CI.

g. Evaluación de la concordancia de los métodos

La concordancia se evaluó haciendo uso de los datos obtenidos en variable dicotómica y cuantitativa.

Primero se calculó el índice Kappa (el cual indica el grado de concordancia entre los métodos). Los resultados se analizaron utilizando los criterios de interpretación según Azzimonti (Azzimonti, 2005, p. 436).

Luego se calculó el coeficiente de correlación muestral y poblacional (en este último se contrastó la H_0 Coeficiente de correlación poblacional igual a cero; H_a : Coeficiente de correlación poblacional es diferente de cero; significancia del 1%) para evaluar la asociación lineal entre los resultados de ambos métodos. Si el valor es mayor a 0.95, se calculó el coeficiente de correlación intraclase que evalúa la concordancia entre dos variables en escala discreta o continua.

VIII. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la comparación del método SimPlate[®] Total Plate Count Color Indicator (TPC CI), con el método convencional de vertido en placa, en el análisis de microorganismos aerobios mesófilos en materias primas y productos terminados en las industrias de alimentos deshidratados por medio de la evaluación de 31 materias primas y 31 productos terminados se presentan a continuación.

En la tabla 1 se muestran las medidas de resumen de los logaritmos de las unidades formadoras de colonias/mL en los productos evaluados. Se observa que los tres promedios y desviaciones estándar, así como las medianas y los rangos intercuartiles son similares.

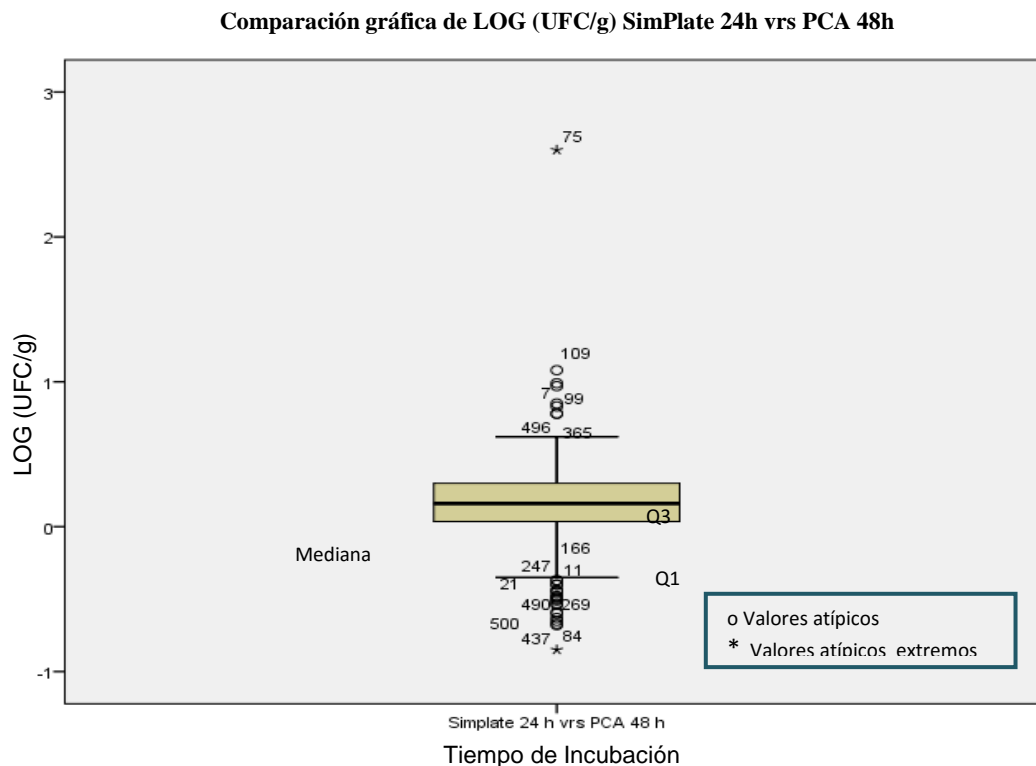
Tabla 1. Medidas numéricas de resumen sobre los logaritmos de las unidades formadoras de colonias/mL en 31 materias primas y 31 productos terminados (n = 456)

Método	Media	Desviación Estándar	Mediana	Rango intercuartil
SimPlate 24 h	3.99	0.70	3.92	0.81
PCA 24 h	3.77	0.73	3.76	0.76
PCA 48 h	3.85	0.68	3.78	0.74

Fuente: Datos experimentales obtenidos por la autora de este trabajo, realizados en el periodo comprendido de Agosto a Octubre 2013.

En la gráfica 1 se muestra un resumen de mediana, valores mínimo y máximo y cuartiles 1 y 3 de las diferencias observadas en la muestra de los logaritmos de las unidades formadoras de colonias entre los métodos evaluados. La mediana de las diferencias está muy cercana a cero.

Gráfica 1. Diferencia entre los logaritmos de las unidades formadoras de colonias/mL en 31 materias primas y 31 productos terminados (n = 475)



En la tabla 2 se observa que no existe una diferencia estadísticamente significativa, entre los valores de las unidades formadoras de colonias en los métodos evaluados, a un nivel de significancia del 5% no se puede rechazar la hipótesis nula, porque el valor de significación o valor p es mayor al nivel de significancia.

Tabla 2. Diferencia entre los logaritmos de las unidades formadoras de colonias/mL en 31 materias primas y 31 productos terminados (n = 475)

Diferencias relacionadas							
Media	Desviación típica	Error típico de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
			Inferior	Superior			
0.00413	0.73828	0.03387	-0.06244	0.07069	0.122	474	0.903

t: t de Student **gl:** grados de libertad **Sig:** Nivel de significación

Fuente: Datos experimentales obtenidos por la autora de este trabajo, realizados en el periodo comprendido de Agosto a Octubre 2013.

Para comprobar los resultados obtenidos a partir de la prueba de t para muestras pareadas se utilizó la técnica de bootstrapping realizando una simulación de 1000 muestreos aleatorios, se observa que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos por uno u otro método. Los resultados se observan en la tabla 3.

Tabla 3. Diferencia entre los logaritmos de las unidades formadoras de colonias/mL en 31 materias primas y 31 productos terminados a través de remuestreo (n = 475)

Media	Bootstrap				
	Sesgo	Error típico	Sig (bilateral)	Intervalo de confianza al 95%	
				Inferior	Superior
0.00413	-0.00074	0.03221	0.909	-0.06201	0.06713

Sig: Nivel de significación

Fuente: Datos experimentales obtenidos por la autora de este trabajo, realizados en el periodo comprendido de Agosto a Octubre 2013.

Los límites de detección del método Simplate se calcularon a partir de la metodología Primera Fase, se observa que hasta la dilución 10^8 , puede haber recuperación bacteriana, por lo que a partir de esta dilución, se considera como el límite de detección.

Tabla 4. Determinación del límite de detección: Primera fase, muestras inoculadas con 1mL de dilución de *E. coli* (n = 10)

Dilución	Categoría	N	Proporción observada	Proporción de prueba	Sig Prueba binomial (una cola)*
Dilución 10^8	Cumple	0	1.00	0.50	0.001
	No cumple	10	0.00		
Dilución 10^9	Cumple	10	1.00	0.50	0.001
	No cumple	0	0.00		

Sig: Nivel de significación

Fuente: Datos experimentales obtenidos por la autora de este trabajo, realizados en el periodo comprendido de Agosto a Octubre 2013.

Nota: Cumple significa que no se recuperó la bacteria.

* Según tabla de probabilidades asociadas con valores pequeños en una prueba binomial (Siegel, 1970).

En la tabla 5 se observa para ambas diluciones que el evento no es aleatorio y proporciona resultados consistentes y significativos, porque el nivel de significación o valor p es mucho menor al nivel de significancia (1%).

En la población muestreada, la probabilidad de recuperar la bacteria en ambas diluciones es baja.

Tabla 5. Determinación del límite de detección, segunda fase, muestras inoculadas con 1mL de dilución de *E. coli* (n=10)

Dilución	Categoría	N	Proporción observada	Proporción de prueba	Sig Prueba binomial (una cola)*
Dilución 10⁸	Cumple	10	0.00	0.50	0.001
	No cumple	0	1.00		
Dilución 10⁹	Cumple	10	1.00	0.50	0.001
	No cumple	0	0.00		

N: Número de muestras analizadas **Sig:** Nivel de significación

Fuente: Datos experimentales obtenidos por la autora de este trabajo, realizados en el periodo comprendido de Agosto a Octubre 2013.

Nota: Cumple significa que no se recuperó la bacteria.

* Según tabla de probabilidades asociadas con valores pequeños en una prueba binomial (Siegel, 1970).

En la tabla 6 se presentan los resultados obtenidos por el analista 1 y analista 2; ambos realizaron tres repeticiones, se considera que el método evaluado cuenta con repetibilidad y que los resultados son consistentes a un nivel de significancia del 5%.

Tabla 6. Evaluación de la repetibilidad: segunda fase, muestras inoculadas con 1mL de dilución de *E. coli* (n=6)

Dilución	Categoría	N	Proporción observada	Proporción de prueba	Sig Prueba binomial (una cola)*
Analista 1	Recuperada	6	1.00	0.50	0.016
	No recuperada	0	0.00		
Analista 2	Recuperada	6	1.00	0.50	0.016
	No recuperada	0	0.00		

N: Número de muestras analizadas **Sig:** Nivel de significación

Fuente: Datos experimentales obtenidos por la autora de este trabajo, realizados en el periodo comprendido de Agosto a Octubre 2013.

* Según tabla de probabilidades asociadas con valores pequeños en una prueba binomial (Siegel, 1970).

En la tabla 7 se observa que en todos los casos, los dos analistas recuperaron la bacteria, por lo que se considera que el método evaluado cuenta con reproducibilidad y que los resultados son consistentes a un nivel de significancia del 1%.

Tabla 7. Evaluación de la reproducibilidad (n=12)

Categoría	N	Proporción observada	Proporción de prueba	Sig exacta (bilateral)
Recuperada	12	1.00	0.50	0.000
	12	1.00		

N: Número de muestras analizadas **Sig:** Nivel de significación

Fuente: Datos experimentales obtenidos por la autora de este trabajo, realizados en el periodo comprendido de Agosto a Octubre 2013. Análisis en SPSS 19.0

En la tabla 8 se observa que la sensibilidad fue alta, mayor a 95% en ambos casos y el intervalo de confianza es corto, por tanto la estimación de este parámetro es satisfactoria. La especificidad obtenida es alta; sin embargo al tener menor cantidad de muestras para su cálculo la estimación del parámetro fue de menor calidad.

La sensibilidad de la prueba en la materia prima fue mejor si se considera las categorías de cumple/no cumple.

Tabla 8. Evaluación de sensibilidad y especificidad de la prueba SimPlate

Muestra	Desempeño	Valor	IC (95%)	
<i>Materia prima</i>	Sensibilidad (%)	100.00	99.74	100
	Especificidad (%)	100.00	75.00	100
<i>Producto terminado</i>	Sensibilidad (%)	99.33	98.25	100
	Especificidad (%)	100.00	94.44	100

IC: Intervalo de confianza

Fuente: Datos experimentales obtenidos por la autora de este trabajo, realizados en el periodo comprendido de Agosto a Octubre 2013.

En la tabla 9 se presenta el coeficiente de correlación intraclase, que evalúa la concordancia entre dos mediciones, tiene un valor alto, por lo tanto la concordancia se considera aceptable al acercarse a la unidad. Una prueba inferencial de varianza indica que la asociación o equivalencia entre las medidas puede observarse en la población y en el intervalo de confianza del 95% hay un rango con valores mayores a 0.750.

Tabla 9. Evaluación de la concordancia a través del coeficiente de correlación intraclase (n=176)

	Correlación intraclase	Intervalo de confianza 95%		Prueba F con valor verdadero
		Límite inferior	Límite superior	Sig
Medidas promedio	0.792	0.751	0.826	0.000

Sig: Nivel de significación

Fuente: Datos experimentales obtenidos por la autora de este trabajo, realizados en el periodo comprendido de Agosto a Octubre 2013.

En la tabla 10 se presenta el coeficiente Kappa de la concordancia de los métodos cuando la variable se ha clasificado como cumple o no cumple. El valor es alto, sin embargo debe considerarse que aquí se hace referencia a la concordancia o equivalencia entre categorías de ambos métodos y no a los valores cuantitativos exactos detectados. Por tanto el coeficiente cumple para ambas pruebas

Tabla 10. Evaluación de la concordancia a través del coeficiente Kappa (n= 62)

K	EE	IC (95.0%)	
0.9146	0.06	0.797	1

K: Índice Kappa **EE:** Error de estimación **IC:** Intervalo de confianza

Fuente: Datos experimentales obtenidos por la autora de este trabajo, realizados en el periodo comprendido de Agosto a Octubre 2013.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este estudio se analizaron 31 muestras de productos alimenticios deshidratados, de origen animal y vegetal, y 31 muestras de materias primas, procesadas y no procesadas. Cada muestra se analizó cinco veces por cada método, simultáneamente.

El análisis se basó en la comparación del método FDA/BAM capítulo 3 para recuento aeróbico en placa y el método SimPlate® Recuento Total - Indicador de Color (TPC -CI) AOAC 2002.07.

A partir de los resultados obtenidos de la media, mediana, desviación estándar y rango intercuartil de las Unidades Formadoras de Colonia por mililitro, recuperadas por ambos métodos (UFC/mL) se establece que el método SimPlate es similar al método estándar de recuento en placa por vertido, como puede observarse en las tablas 1, 2 y 3. Se comprueba que no existe diferencia significativa, al utilizar ambos métodos, lo que se confirma a través de la prueba t.

En un estudio realizado por Feldsine, Leung, Lienau, Mui & Townsend (2003), el método Simplate® Total Plate Count Color Indicator (TPC CI) fue comparado con el método de vertido en placa AOAC (966.23) para el recuento de microorganismos aerobios totales, evaluando seis tipos de alimentos (productos deshidratados, alimentos congelados y vegetales frescos) con obtención de una diferencia de <0.3 en la media del logaritmo y una diferencia muy cercana a cero en la desviación estándar, del recuento de microorganismos aerobios por el método SimPlate y el método de referencia. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en el presente estudio con una diferencia de 0.14 en la media del logaritmo y una diferencia cercana a cero en la desviación estándar.

Las tablas 4 y 5 muestran los resultados de la determinación del límite de detección del método SimPlate® TPC CI. De acuerdo a la metodología propuesta, la determinación consistió en dos fases; en la primera fase se inocularon un total de 10 muestras con un mL de una dilución de *E. coli*, en esta fase se determinó que a partir de la dilución 10^8 , es posible recuperar la bacteria hasta esta dilución por lo tanto, dicha dilución corresponde al límite de detección del método (tabla 4).

En cuanto a la segunda fase, se inocularon 10 muestras con las diluciones anteriormente determinadas, es decir, 10 muestras inoculadas con la dilución 10^8 y 10 muestras inoculadas con la dilución 10^9 . En esta fase se determinó que para ambas diluciones los resultados del conteo son consistentes y significativos, porque el valor de p es mucho menor al nivel de significancia (1%) y la probabilidad de recuperar la bacteria en ambas diluciones es baja (tabla 5).

Para determinar la repetibilidad y reproducibilidad, se analizaron 6 muestras por 2 analistas, cada uno con sus propias condiciones de análisis. Las muestras fueron inoculadas con 1 mL de *E. coli* de la dilución 10^8 , límite de detección previamente determinado; los resultados demuestran que ambos analistas recuperaron la bacteria en un 100%, por lo que el método SimPlate TPC CI cuenta con repetibilidad, y reproducibilidad (tablas 6 y 7).

En cuanto la sensibilidad, se obtuvo una mayor en el análisis de materia prima (100%) en comparación con el análisis de producto terminado (99.33%).

La especificidad fue aceptable (100%), tanto para materia prima como para producto terminado, sin embargo este parámetro fue menos significativo porque se obtuvo con un número bajo de muestras positivas para realizar el cálculo (tabla 8).

Una de las razones de obtener muestras negativas, puede ser la demostrada en el estudio realizado por Nero, A. et al., en el año 2002, en donde se encontró que muestras con conteo alto de microorganismos aerobios mesófilos correspondientes a bacilos gram positivo, podían dar pozos de falsos negativos, detectados por el método SimPlate TPC CI, probablemente el crecimiento de estas bacterias es lento, o que tienen la capacidad de reducción baja, de la enzima que contiene el método.

Para evaluar la concordancia entre ambos métodos, se calculó a partir del coeficiente de correlación intraclase, y para este caso el valor fue alto (0.792), por lo que se considera que la concordancia es aceptable. El intervalo de confianza al 95% presentó valores mayores a 0.750.

El coeficiente de Kappa se calculó porque la variable se caracteriza con el criterio de cumple/no cumple. El valor es alto (0.9146), y se tuvo un intervalo de confianza del 95%

entre 0.797 y 1, lo que indica que existe concordancia entre ambos métodos, sin embargo, se debe tomar en cuenta que se hace referencia a la concordancia o equivalencia entre categorías de ambos métodos y no a los valores cuantitativos exactos detectados. El coeficiente por lo tanto cumple, de acuerdo en los resultados de ambas pruebas.

X. CONCLUSIONES

1. El método SimPlate[®] Total Plate Color Indicator, puede emplearse como método alternativo para el recuento de aerobios mesófilos, en las industrias guatemaltecas que elaboran productos alimenticios deshidratados, porque permite optimizar los procesos y disminuir el tiempo que se requiere para el análisis de las muestras, asegurando la confiabilidad en los resultados, los cuales serán obtenidos en un tiempo mínimo, lo que implica reducción de costos y tiempo de liberación de los productos terminados.
2. El límite de detección del método SimPlate[®] TPC CI corresponde a la dilución 10^8 , ya que es en esta concentración donde hay probabilidad de recuperar la bacteria para productos alimenticios deshidratados.
3. El método SimPlate[®] TPC CI cuenta con repetibilidad y reproducibilidad aceptables, en el recuento de aerobios mesófilos en productos alimenticios deshidratados.
4. El método SimPlate[®] TPC CI tiene una alta sensibilidad en el recuento de aerobios mesófilos, con un porcentaje mayor (100%) para las materias primas que se emplean para la elaboración de productos alimenticios deshidratados.
5. El método SimPlate[®] TPC CI tiene una especificidad aceptable en el recuento de aerobios mesófilos, tanto para las materias primas como para el producto terminado de alimentos deshidratados.
6. El método SimPlate[®] TPC CI tiene una adecuada concordancia, para el recuento de aerobios mesófilos para productos alimenticios deshidratados, con relación al método estándar de recuento en placa, además que cuantitativamente ambos métodos no presentan diferencia significativa ($p = 0.903$).

XI. RECOMENDACIONES

1. Implementar el método SimPlate[®] TPC CI, como método alternativo al método estándar de recuento en placa, en el laboratorio de la industria de productos alimenticios deshidratados.
2. Para obtener una especificidad más significativa, se recomienda realizar un estudio con un número mayor de muestras, asimismo evaluar la ocurrencia de falsos positivos y falsos negativos de los pozos .
3. Realizar la detección de pozos falsos positivos y falsos negativos en las placas de SimPlate TPC CI y la posterior caracterización de las bacterias , para determinar la microbiota predominante, principalmente, en muestras que presenten recuentos altos de aerobios mesófilos.
4. Aunque los resultados obtenidos son aceptables, no se evaluaron muestras que contengan tomate, ajo o cebolla, por lo que se recomienda para estudios posteriores, la evaluación del método SimPlate TPC CI, con este tipo de productos, para determinar de qué forma afecta la acidez del producto al potencial redox de la resarzurina, componente principal del reactivo.
5. Establecer un estudio de evaluación interlaboratorios de las distintas empresas de productos alimenticios en Guatemala, para establecer la eficacia del método SimPlate[®] TPC CI, y determinar si es posible emplearlo en distintos productos.
6. Realizar otros estudios de evaluación del método SimPlate[®] TPC CI, en productos terminados y materias primas, cuyo ingrediente base sea el tomate, ajo o cebolla, para determinar de qué forma afecta la acidez de estos productos, en el potencial redox de la resarzurina.

7. Realizar estudios para verificación del método SimPlate[®] TPC CI en otras matrices como leches, productos congelados o refrigerados, productos a base de cocoa, confitería, entre otros .
8. Llevar a cabo la lectura de resultados a las 48 horas de incubación por el método SimPlate[®] TPC CI y comparar estos resultados con los del método estándar por vertido en placa, para determinar si la eficiencia del método SimPlate[®] TPC CI incrementa cuando las placas son incubadas por 48 horas.

XII. REFERENCIAS

- Abbey, S., Heaton, E., Golden, D & Beuchat, L. (1988). Microbiological and sensory quality changes in unwrapped and wrapped sliced watermelon. *Journal of Food Protection*, 51(7), 531-533.
- Alonso L. & Poveda J. (2008). *Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido, en el mercado y placas PetrifilmTM y 3MTM para el análisis de Alimentos*. Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Águila, M. y Romero, C. (2000). Deshidratación osmótica de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). *Journal of Food Science*, 48. 202-205.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *Method 966.23. Microbiological Methods; Aerobic Plate Count Method*. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18a ed. Gaithersburg.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *Method 2002.07. Total Bacterial Count by SimPlate[®] Method*. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18a ed. Gaithersburg.
- Azzimonti, J. (2005). La concordancia entre dos tests clínicos para casos binarios: Problemas y Solución. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(4), 435-444.
- Beuchat, L. et al. (1998). Comparison of the SimPlate[®], Total Plate Count Method with PetrifilmTM, RedigelTM, and Convencional Pour-plate Methods for enumerating aerobic microorganisms in foods. *Journal of Food Protection*, 51(7), 531-533.
- Bilbao, C. (2002). *Estudio del secado combinado aire/microondas en manzana Granny Smith*. Tesis de Doctorado. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Chiralt, A., Martínez Navarrete N., Martínez Monzó J., Talens P., Moraga G., Ayala A. & Fito P. (2001). Changes in mechanical properties throughout osmotic processes cryoprotectant effect. *Journal of Food Engineering*, 49, 129-135.

- Codex Alimentarius. (1971). Código de Prácticas de Higiene para las Frutas y Hortalizas deshidratadas, CAC/RCP 5-1971. World Health Organization.
- Código Alimentario Argentino. (2011). Art. 1413 y 1414.
- Colwell, N. & Morisetti, M. (1969). Microbiological techniques - Some statistical aspects. *Journal of Science Food and Agriculture*, 20, 550-573.
- Contreras, C. (2006). Influencia del método de secado en parámetros de calidad relacionados con la estructura y el color de manzana y fresa deshidratadas. Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica. Valencia España.
- De Sousa, T., Tamagnini, L.M., González, R.D. & Budde, C.E. (2005). Evaluation of Petrifilm™ method for enumerating aerobic bacteria in Crottin goat's cheese. *Revista argentina microbiológica*, 37(4), 214-216. Recuperado de: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412005000400010&lng=es&nrm=iso. ISSN 1851-7617.
- Downes, F. & Ito, K.. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (4th ed.). Washington DC: APHA., pp.63-67
- Feldsine, P., Leung, S., Lienau, A., Mui, L. & Townsend, D. (2003). Enumeration of total aerobic microorganisms in foods by SimPlate® Total Plate Count-Color Indicator methods and conventional culture methods, collaborative study. *Journal of AOAC International*, 86 (2), 257-274.
- Food And Drug Association (FDA). (1998). Bacteriological Analytical Manual (BAM): *Rapid methods for detecting foodborne pathogens*. 8th Edition. United States of America.
- Food And Drug Association (FDA). (1998). Bacteriological Analytical Manual (BAM): *Chapter 3: Aerobic plate count*. 8th Edition. United States of America.

- Food And Drug Association (FDA). (1995). Bacteriological Analytical Manual BAM. 8a Edición. Gaithersburg, United States of America.
- Fundación para la Innovación Tecnológica Agropecuaria. (2003). Estrategias en productos deshidratados. San Salvador, El Salvador.
- Gilabert, E. (2006). *Medida del color*. Servicio de publicaciones, Universidad Politécnica. Valencia, España.
- González, E. (2007). Análisis comparativo de las propiedades organolépticas de zanahoria deshidratada con y sin pre tratamiento osmótico. Tesis de Grado. Universidad de San Carlos, Facultad de Ingeniería, Guatemala.
- Guerrero, L. y Núñez, M. (1991). *El proceso de secado en los alimentos. Alimentación, Equipos y Tecnología*. Valencia, España. Universidad Politécnica de Valencia.
- Harrigan, W. y McCance, M. (1979). Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. 2ª Edición. España. Academia León.
- Hayes, P. Microbiología e Higiene de los Alimentos. (1993). Zaragoza: Acribia.
- Health and Consumer Protection Directorate General- European Commission. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on the evaluation of microbiological criteria for food products of animal origin for human consumption, 1999. Recuperado de: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out26_en.html
- Hernández, J. (2008). Desarrollo de un bocadillo a base de banano (*Musa paradisiaca*) y piña (*Ananas comosus* var. azucarona) deshidratada cubierta con chocolate. Zamorano, Honduras: Proyecto especial del Programa de Ingeniería Agroindustrial.
- Hocking, A. & Pitt, J. (1980). Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low- moisture foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(3), pp. 488-492.

- Holdsworth, S. (1988). *Conservación de Frutas y Hortalizas*. 1ª Edición. Zaragoza, España: Acribia, p.3
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (2003). *Microorganismos de los Alimentos 1: Técnicas de análisis microbiológico*. 2ª ed. Zaragoza: Acribia.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (1999). *Microorganismos de alimentos: Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones específicas*. 2ª ed. Zaragoza: Acribia.
- Jarén, C. (2005). *Perfil del consumidor de frutas, hábitos y tendencia*. Fruticultura Profesional. Valencia, España. Universidad Politécnica de Valencia.
- Jackson, W. et al. (2000). Multiregional evaluation of the SimPlate® heterotrophic plate count method compared to the standard plate count agar pour plate method in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), pp 453-454.
- Jordano, R. (2008). *Técnicas alternativas para análisis microbiológico*. España. Universidad de Córdoba, Depto. de Bromatología y Tecnología de los alimentos.
- Lara, A. et al. (1976). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. *Métodos químicos e físicos para análisis de alimentos. I*. Sao Paulo: Instituto Adolfo Lutz.
- Maupoey, P. et al. (2001). *Introducción al secado de alimentos por aire caliente*. Universidad Politécnica, Valencia, España.
- International Standard Organization (ISO). (2003). *Microbiology – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30 °C*. ISO 4833:2003, 2003. International Standard Organization.
- Nero, A. et al. (2002). Assessment of the efficiency of SimPlate® Total Plate Count Color Indicator (TPC CI) to quantify mesophilic aerobic microorganisms in pasteurized milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(1), pp. 44-48.

- Nguyen, C. & Carlin, F. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Zaragoza: Acribia.
- Panglioli, P., Jackson, F., Richards, H., Mount, J. & Draughon, A. (2006). Comparison of conventional plating and SimPlate[®] methods for enumeration of aerobic microorganisms coliform and *E. coli* in farm environmental samples. *Journal of Rapid Methods and Automation in microbiology*, 14(3), pp. 258 – 265.
- Pascual, M. (1989). *Microbiología Alimentaria: Detección de bacterias con significado higiénico-sanitario*. Madrid, España. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Penteado, A. y Leitao, M. (2004). Selected pathogenic bacteria on freshly peeled Hamlin orange. *Journal of Food Science*, 63(2), pp. 359-362.
- Pisabarro G. (2007). *Métodos generales de análisis microbiológico de los alimentos; Detección de microorganismos índices e indicadores*. Pamplona, España.
- Ramazotti, A., Tavolaro, P., Destro, M., Landgraf, M. y Franco, B. (2005). A comparison of ready-to-use systems for evaluating the microbiological quality of acidic fruit juices using non-pasteurized orange juice as an experimental model. *International Microbiology*, 8(1), pp. 49-53.
- Rosenthal, A. (2001). *Textura de los alimentos: medida y percepción*. Zaragoza:Acribia.
- Ruiz, W. (2004). Crema de berros y espárragos. *Revista Tecnológica*, 17, pp. 23-45.
- Smith C., & Townsend, D. (1999). A new medium for determining the total plate count in food. United States of America. *Journal of Food Protection*, 62(12), pp. 1404-1410.
- Speck, M. (2002). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2.ed. Washington, USA. American Public Health Association.

Townsend, D. & Naqui, A. (1998). Comparison of the SimPlate[®] Total Plate Count Test with Plate Count Agar Method for detection and quantification of bacteria in food. *Journal of AOAC International*, 81(3), pp. 563-569.

World Health Organization. (2001) Safety evaluation of certain mycotoxins in foods. Geneva.

XIII. ANEXOS

Anexo 1: Tablas muestras de validación y muestras de análisis.

Anexo 2: Diagrama de flujo procedimiento de análisis de microorganismos aerobios mesófilos por el método vertido en placa.

Anexo 3: Elaboración del medio de cultivo Plate Count Agar

Anexo 4: Cálculo e informe de resultados recuento de microorganismos aerobios mesófilos

Anexo 5: Diagrama de flujo procedimiento de análisis de microorganismos aerobios mesófilos por el método SimPlate TPC CI.

Anexo 6: Procedimiento de análisis de microorganismos aerobios mesófilos por el método SimPlate TPC CI.

Anexo 7: Tabla de conversión método SimPlate TPC CI

Anexo 8: Fotografías tomadas durante el ensayo

Anexo 1

Tablas muestras de validación y muestras de análisis

Tabla 1

Número de muestras para validación (Reproducibilidad, repetibilidad)

Muestras para validación		
Método SimPlate®	Muestras	
TPC CI	Analista A	Analista B
Reproducibilidad	6	6
Repetibilidad	Las muestras de A y B por separado	

Tabla 2

Número de muestras para investigación (producto terminado)

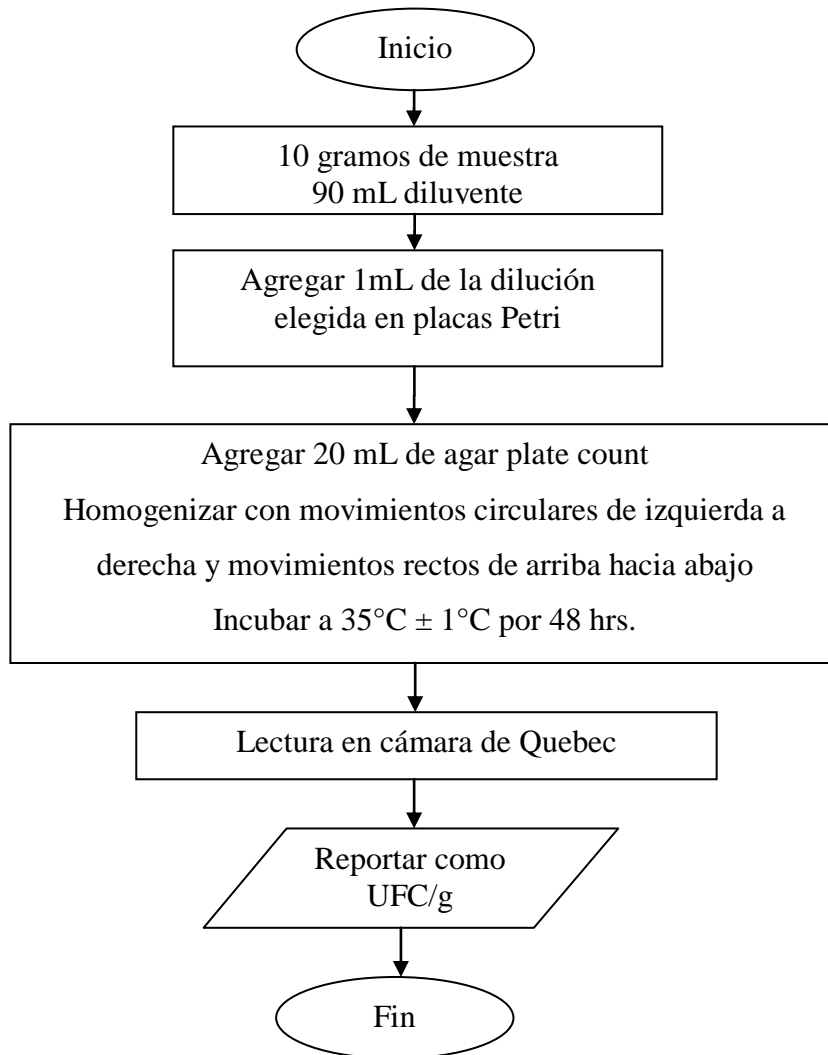
Productos	Muestras	
	Método A	Método B
Sopas	10	10
Consomés	10	10
Sazonadores	11	11
Total	31	31

Tabla 3

Número de muestras para investigación (materia prima)

Productos	Muestras	
	Método A	Método B
Espicias	10	10
Hortalizas	10	10
Granos	11	11
Total	31	31

Anexo 2
Diagrama de Flujo
Procedimiento de análisis de microorganismos aerobios mesófilos por el método
vertido en placa.



Tomado de Food And Drug Association (FDA). (1998). Bacteriological Analytical Manual (BAM):
Chapter 3: Aerobic plate count. 8th Edition. United States of America.

Anexo 3

Elaboración del medio de cultivo Plate Count Agar

Plate Count Agar (Casein-peptone Dextrose Yeast Agar)

Composición (g/litro)

Triptona	5.0
Extracto levadura	2.5
Glucosa	1.0
Agar- agar	14.0

Preparación

Suspender 22.5 g/litro. Poner en tubos o frascos y autoclavar (15 min a 121 °C).

pH: 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

Anexo 4
Cálculo e informe de resultados recuento de
microorganismos aerobios mesófilos

Si los recuentos de las placas de dos diluciones consecutivas caen dentro del rango 25-250 UFC calcular el RAM según la siguiente fórmula:

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

donde :

N = número de colonias por mL o g de producto

$\sum C$ = suma de todas las colonias contadas en todas las placas

n_1 = número de placas contadas de la menor dilución.

n_2 = número de placas contadas de la dilución consecutiva.

d = dilución de la cual fue obtenido el primer recuento

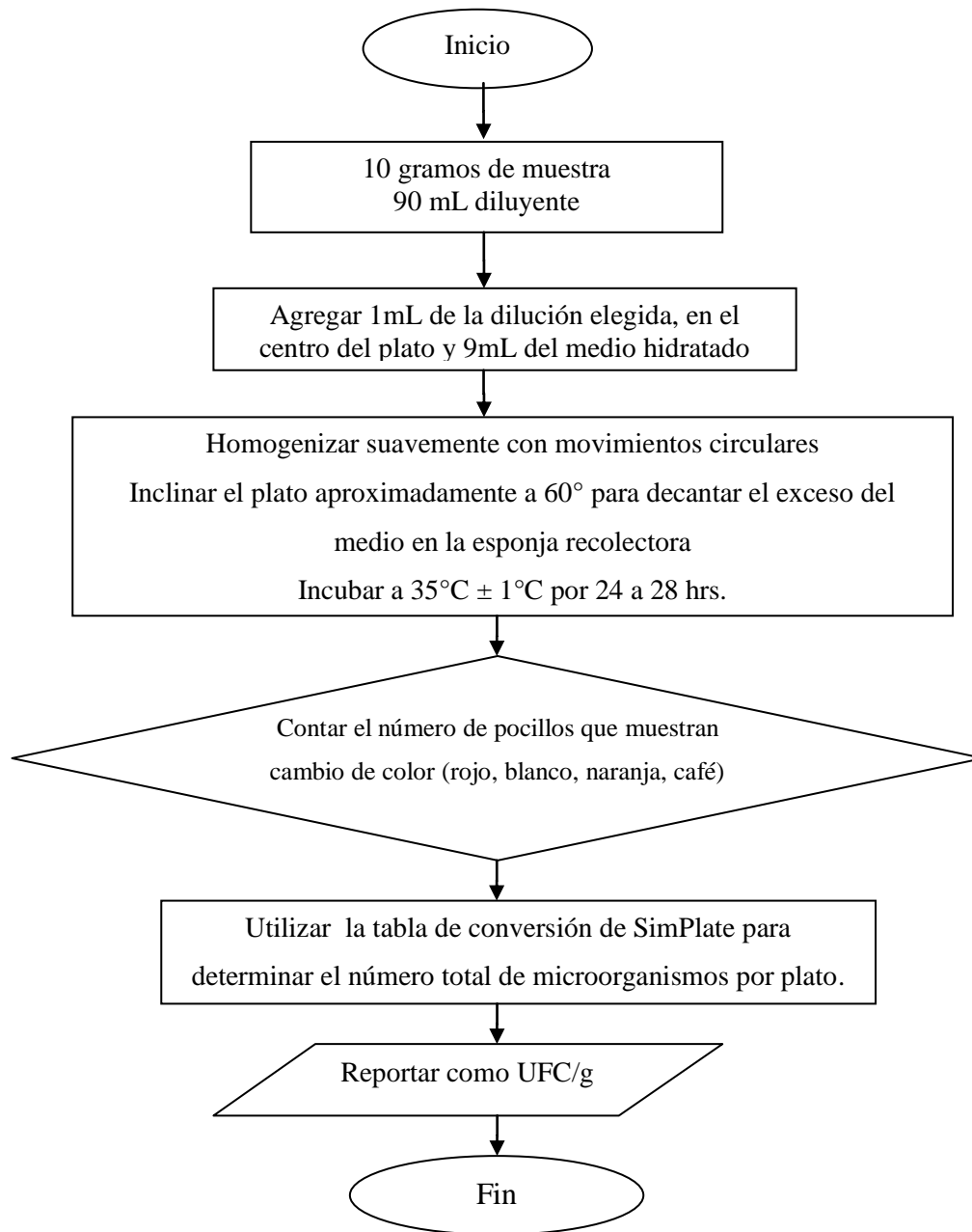
Ejemplo :

A. 1:100	B. 1:1000
232, 244	33, 28

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{(232 + 244 + 33 + 28)}{[(1 \times 2) + (0.1 \times 2)]10^2} \\
 &= 537/0.022 \\
 &= 24,409 \\
 &= 24,000
 \end{aligned}$$

Tomado de Food And Drug Association (FDA). (1998). Bacteriological Analytical Manual (BAM): *Chapter 3: Aerobic plate count*. 8th Edition. United States of America.

Anexo 5
Diagrama de Flujo
Procedimiento de análisis de microorganismos aerobios mesófilos por el método
SimPlate® TPC CI (AOAC, 2005).



Tomado de Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *Method 2002.07. Total Bacterial Count by SimPlate® Method*. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18a ed. Gaithersburg.

Anexo 6

Procedimiento de análisis de microorganismos aerobios mesófilos por el método SimPlate TPC CI (AOAC,2005).

SimPlate

BIOCONTROL

Results. Right now.

Recuento Total con Indicador de Color

Introducción

El método Simplate Recuento Total - Indicador de Color (TPC -CI) es usado para la detección y cuantificación de bacterias aeróbicas totales. La mezcla del medio y la muestra es transferida a la placa Simplate e incubada por lo menos de 24 a 28 horas. El medio cambia de color con la presencia de microorganismos aeróbicos. El recuento total de aeróbicos es determinado al cuantificar el numero de posillos que cambian de color y usando como referencia la tabla de conversion del Simplate. La placas Simplate son vendidas y empacadas separadamente.

I Medio para prueba individual

Componentes del kit

100 viales individualmente empacados con medio TPC-CI deshidratado. El contenido de cada vial es para una prueba.

A. Preparación de la muestra

- (a) Pesar 50 g de muestra en 450 mL de diluyente estéril (ejemplo: agua deionizada o solución de Buffer Fosfatado (Butterfield's Phosphate Buffer) o 0.1% de Agua Peptonada en dilución 1:10. Homogenizar: Si la cantidad de la muestra es menos de 50 g, pesar una porción equivalente a la mitad de la cantidad que tiene y agregar diluyente para tener al final una dilución 1:10.
- (b) Si la preparación de la muestra ya está especificado en su método de rutina entonces basta preparar una solución con el 10% del peso de esta solución.
- (c) Si es necesario se pueden preparar diluciones seriales de 10 cuando de antemano se conozca la concentración aproximada de microorganismos en la muestra.

B. Procedimiento de la prueba

- (a) Hidratar el medio de cultivo en 9.0 mL o 9.9 mL del diluyente estéril (ejemplo: agua deionizada, Butterfield's Phosphate Buffer o 0.1% de solución de Agua Peptonada) Transferir 1.0 mL o 0.1 mL de la muestra homogenizada al frasco que contiene el medio. El volumen final dentro del frasco debe ser de 10 mL \pm 0.2 mL. Agitar para disolver el medio totalmente.
- (b) Retirar la tapa de la placa Simplate y vaciar la solución medio/muestra en el centro de la placa (Figura 1). Cerrar la placa. Continuar con el paso (c) de la próxima página.

M Medio para prueba múltiple

Componentes del kit

20 viales con medio TPC-CI deshidratado. El contenido de cada vial es suficiente para 10 pruebas.

A. Preparación de la muestra

- (a) Pesar 50 g de muestra en 450 mL de diluyente estéril (ejemplo: agua deionizada o solución de Buffer Fosfatado (Butterfield's Phosphate Buffer) o 0.1% de Agua Peptonada) en dilución 1:10. Homogenizar: Si la cantidad de la muestra es menos de 50 g, pesar una porción equivalente a la mitad de la cantidad que tiene y agregar diluyente para tener al final una dilución 1:10.
- (b) Si la preparación de la muestra ya está especificado en su método de rutina entonces basta preparar una solución con el 10% del peso de esta solución.
- (c) Si es necesario se pueden preparar diluciones seriales de 10 cuando de antemano se conozca la concentración aproximada de microorganismos en la muestra.

B. Procedimiento de la prueba

- (a) Vaciar el medio deshidratado en 100 mL de diluyente estéril (ejemplo: agua deionizada o solución de Buffer Fosfatado (Butterfield's Phosphate Buffer) o 0.1% de Agua Peptonada). Agitar para disolver el medio totalmente.
- (b) Retirar la tapa de la placa Simplate, usando una pipeta depositar 1.0 mL o 0.1 mL de la muestra ya homogenizada en el centro del plato (Figura 2). Agregar a la muestra y en el centro del plato 9.0 mL o 9.9 mL del medio hidratado. Al final el volumen total del líquido deberá ser 10 \pm 0.2 mL. Inmediatamente ponga la tapa sobre el plato. Continúe con el paso (c) de la siguiente página.

Cubiertos con la patente en U.S.A. No. 5,700,655;5,985,594; Patente AU No. 723048. Otras patentes pendientes.

No. De catálogo Plato Simplate 65000-20
 Medio para prueba individual Simplate TPC-CI 65002-100U
 Medio para prueba múltiple Simplate TPC-CI 65002-200M

55030.R004.032001

Fuente: Inserto proporcionado por proveedor

B. Procedimiento de prueba para muestras Individuales y Múltiples

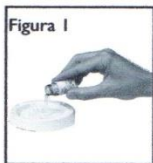
- (c) Sobre la superficie plana agitar suavemente en círculos con el fin de distribuir la mezcla del medio y la muestra en todos los pocillos (Figura 3). El plato puede ser tomado con las dos manos para inclinarlo ligeramente y así ayudar a distribuir el líquido en los pocillos.
- (d) Si es necesario, golpear SUAVEMENTE en una superficie dura para eliminar las burbujas de aire que se hayan quedado atrapadas en los pocillos (Figura 4). No preocuparse si algunos pocillos están parcialmente llenos. Los pocillos que estén parcialmente llenos de líquido serán positivos si hay presencia de bacterias viables. Evite el uso excesivo de fuerza al golpear para evitar que el líquido entre en contacto con la tapa.
- (e) Presionando ligeramente la tapa contra el plato en cualquier lado de la cavidad de la esponja vaciar el exceso de medio. Inclinar el plato hacia Ud. para permitir que la esponja absorba el líquido (Figura 5). Observe el color base de los pocillos. Este color base es la mezcla de medio y muestra dentro de los pocillos.
- (f) Invierta el dispositivo Simplate. De acuerdo con los métodos AOAC[®]/BAM/USDA incubar de 24 a 48 h a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ($32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para productos lácteos).

C. Lectura e interpretación de resultados

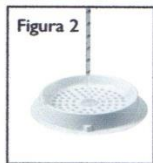
- (a) Después de incubar, observe el cambio de color del líquido en los pocillos. No le ponga atención a las partículas presentes. Cuente el número de pocillos que tengan un cambio de color con respecto al color base. El cambio de color mas común producido por microorganismos es ROSA, pero los siguientes colores se les deberá poner atención : naranja, rojo, café, y blanco.
- (b) Para determinar la concentración por plato, ejecute los siguientes cálculos :
 - (1) Cuente el número de pocillos positivos en el plato
 - (2) Utilice la tabla de conversión de Simplate para determinar el número total de microorganismos por plato
 - (3) Si el tamaño de la muestra es de 0.1 mL, vea B(a), multiplique el número anterior (b) por 10.
- (c) Para calcular el número de microorganismos por muestra, multiplicar la cuenta (b)(2) o (b)(3) por el factor de dilución, ver A(a-c).

D. Información del Producto y su almacenamiento.

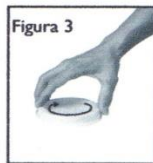
- (a) No usar el dispositivo del Simplate si los pocillos están dañados y perforados.
- (b) No use el producto si ya expiró.
- (c) Almacenar el medio hidratado entre 4°C y 25°C y úselo dentro de las 12 hs. siguientes.
- (d) Maneje y deshágase del medio incubado en un contenedor de descontaminación esterilizando de acuerdo a las Buenas Prácticas de Laboratorio.



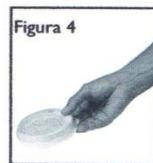
Para la prueba individual, deposite la mezcla muestra/medio en el centro del plato Simplate.



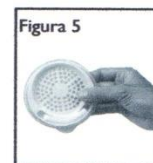
Para prueba Múltiple, pipetear la muestra en el centro del plato. Agregar el medio hidratado hasta volumen total de 10 ± 0.2 mL.



Cerrar la tapa, suavemente mover el plato para distribuir la muestra/medio en los pocillos.



Si es necesario golpear suavemente el plato para eliminar burbujas.



Inclinar el plato hacia Ud. para permitir que la esponja absorba el líquido.

Garantía del Producto

BioControl Systems, Inc. (BCS) garantiza este producto para estar libre de defectos en material y mano de obra, siempre y cuando sea almacenado en condiciones apropiadas y sea manejado adecuadamente hasta la expiración de la vida de anaquel especificada. BioControl está de acuerdo que durante el periodo de esta garantía a reemplazar todos los productos defectuosos dentro de los 30 días posteriores después que el producto sea devuelto a BCS sin ningún cargo para el Comprador. BCS no tendrá obligación alguna bajo esta Garantía Limitada de hacer reemplazos que resulten parcial o totalmente derivados de alguna catástrofe, falla o negligencia del Comprador o cualquiera que reclame a través o a nombre del Comprador, o por uso inadecuado, o por usar el producto en una manera para la cual no fué designada, o por causas externas a los productos. El Comprador deberá notificar a BCS de cualquier producto los cuales crea están defectuosos durante el periodo de la garantía. BCS tendrá la opción que tales productos sean regresados por el Comprador a BCS con el costo del transporte y seguros prepagados. BCS deberá reemplazar dentro de los 30 días posteriores después de recibido los productos que sean encontrados como defectuosos y regresar los más rápido posible al Comprador tales productos con el costo de transporte y seguro prepagados. Si después de examinar y probar los productos recibidos BCS encuentra que los productos no están cubierto por la garantía, BCS comentará al Comprador y dispondrá de los productos de acuerdo a las instrucciones del Comprador. El Comprador cubrirá todos los gastos derivados de esto.

AOAC[®] es una marca registrada de AOAC International. BioControl[®] y SimPlate[®] son marcas registradas de BioControl Systems, Inc.

Si Ud. requiere mas información acerca de Simplate para Cuenta Total - CI, su uso o cualquiera de los otros productos de BioControl favor de ponerse en contacto con BioControl Systems, Inc. · 800.245.0113 or 425.603.1123 · Fax 425.603.0080 · www.rapidmethods.com

Fuente: Inserto proporcionado por proveedor.

Anexo 7

Tabla de conversión método SimPlate TPC CI

SimPlate Conversion Table		
positive wells = population ^a	positive wells = population	positive wells = population
1 = 2	29 = 70	57 = 190
2 = 4	30 = 74	58 = 196
3 = 6	31 = 76	59 = 202
4 = 8	32 = 80	60 = 208
5 = 10	33 = 84	61 = 216
6 = 12	34 = 86	62 = 224
7 = 14	35 = 90	63 = 232
8 = 16	36 = 94	64 = 240
9 = 18	37 = 96	65 = 248
10 = 22	38 = 100	66 = 256
11 = 24	39 = 104	67 = 266
12 = 26	40 = 108	68 = 276
13 = 28	41 = 112	69 = 288
14 = 30	42 = 116	70 = 298
15 = 32	43 = 120	71 = 312
16 = 36	44 = 124	72 = 324
17 = 38	45 = 128	73 = 338
18 = 40	46 = 132	74 = 354
19 = 42	47 = 136	75 = 372
20 = 46	48 = 142	76 = 392
21 = 48	49 = 146	77 = 414
22 = 50	50 = 150	78 = 440
23 = 54	51 = 156	79 = 470
24 = 56	52 = 160	80 = 508
25 = 58	53 = 166	81 = 556
26 = 62	54 = 172	82 = 624
27 = 64	55 = 178	83 = 738
28 = 68	56 = 184	84 = >738

Fuente: Inserto proporcionado por proveedor.

Disponible en: http://www.insulab.es/folletos_comerciales/Biocontrol_Simplate_cosmeticos.pdf

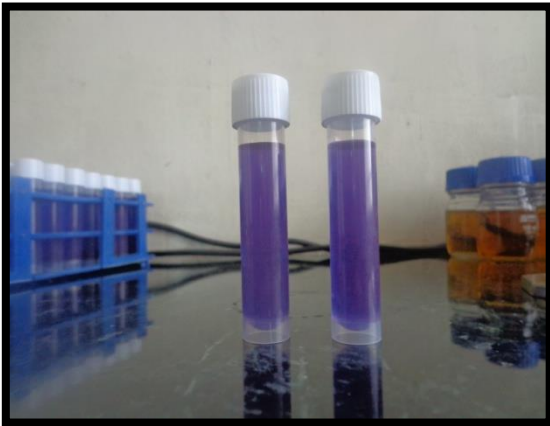
ANEXO 8**Fotografías tomadas durante el ensayo****A. Procedimiento de análisis de microorganismos aerobios mesófilos por el método SimPlate TPC CI.**

Figura 1. Reconstituir reactivo

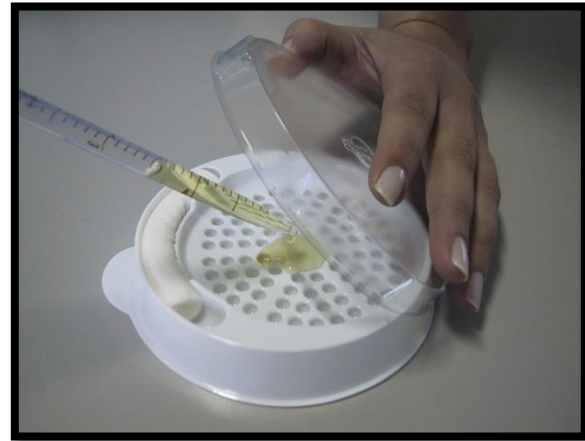


Figura 2. Agregar muestra

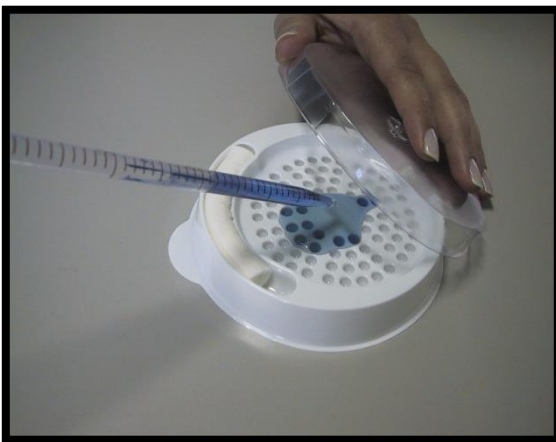


Figura 3. Agregar reactivo



Figura 4. Homogenizar

B. Resultados obtenidos durante el ensayo

Obsérvese el cambio de color del reactivo con la presencia de microorganismos aerobios



Figura 1. Cambio de color en todos los pozos



Figura 2. Pozos negativos = 9 (color purpura)

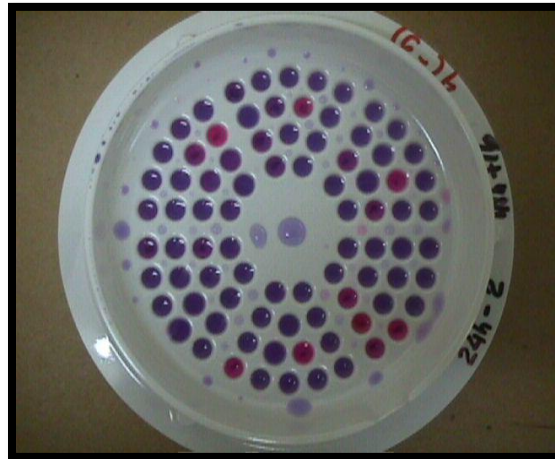


Figura 3. Pozos positivos = 9 (color rosa)