

Máster en Biotecnología del Medioambiente y la
Salud

**“Validación y cálculo de incertidumbre para la
determinación de microorganismos indicadores,
mediante microbiología clásica y NMP
automatizado, en matrices cárnicas”**

Institución: Asociación de Industrias Cárnicas del Principado
de Asturias

Trabajo de Fin de Máster por:

Alejandra Menéndez López

Junio 2013

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES	5
2.1 Validación de un método analítico	5
2.2 Validación en microbiología	6
2.3 Aerobios mesófilos (AM), Enterobacterias (EB) y <i>Escherichia coli</i> (EC)	7
2.3.1 Microbiología e indicadores	7
2.3.2 Determinación de los indicadores y niveles permitidos	8
2.4 Método de microbiología clásica: Siembra por inclusión y recuento en placa.....	9
2.5 TEMPO.....	9
2.5.1 Fundamento	10
2.5.2 Funcionamiento	11
3. LEGISLACIÓN Y NORMATIVA	14
3.1 Legislación	15
Reglamento (CE) Nº 2073/2005, Relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y su posterior modificación, Reglamento (CE) Nº 1441/2007).	15
3.2 Normativa.....	15
ISO 17025:2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.	15
ISO/TS 19036. Directrices para la estimación de la incertidumbre de medidas en determinaciones cuantitativas.....	15
ISO 7218:2007. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico.....	16
ISO 16649-2:2001, ISO 4833:2003 e ISO 21528-2:2004 de Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal.....	16
4. OBJETIVO DEL PROYECTO.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1 Planificación de la validación	18
5.2 Matrices, equipos, medios de cultivo y cepas.....	18

5.3 Inóculo.....	20
5.4 Cóctel bacteriano	20
5.5 Preparación y dopaje de matrices.....	21
5.6 Análisis de matrices.....	21
6. CÁLCULO ESTADÍSTICO	23
6.1 Condiciones de repetibilidad.....	23
6.2 Condiciones de reproducibilidad.....	24
7. RESULTADOS	26
7.1 Materiales y métodos	26
7.2 Recuentos microbiológicos	26
7.3 Tratamiento estadístico y cálculo de la incertidumbre.....	26
7.3.1 Condiciones de repetibilidad.....	26
7.3.2 Condiciones de reproducibilidad	34
8. CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA.....	39

RESUMEN

En el presente TFM se describe la realización y desarrollo del proceso de validación de dos métodos analíticos utilizados en microbiología alimentaria para tres parámetros microbiológicos: Aerobios mesófilos, Enterobacterias y *E. coli*. Los métodos a validar son el análisis mediante microbiología clásica de cada parámetro, recogido en la normativa ISO correspondiente, y mediante el sistema automatizado TEMPO (bioMérieux), el cual se basa en el método del número más probable (NMP). La validación se llevó a cabo para cinco matrices alimentarias del tipo carne fresca, producto cárnico y/o plato preparado. Los parámetros de validación estudiados fueron Precisión y Exactitud bajo condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad. Bajo estas últimas condiciones también se realizó el cálculo de la Incertidumbre, permitiendo comparar el resultado obtenido en cada método para cada parámetro. Bajo ambas condiciones experimentales y en ambos métodos analíticos se cumplieron los parámetros de Precisión y Exactitud previamente establecidos, independientemente del parámetro microbiológico. La Incertidumbre obtenida fue mayor para el análisis mediante TEMPO que mediante microbiología clásica, lo que concuerda con lo esperado debido a la propia naturaleza de sistema TEMPO. Tras los resultados obtenidos se concluye que ambos métodos analíticos son válidos para el análisis de los tres parámetros microbiológicos en las matrices alimentarias validadas.

ABSTRACT

The present Master's Thesis describes the accomplishment and development of a validation process of two analytical methods used in food microbiology for three microbiological parameters: total viable count, Enterobacteria and *E. coli*. The methods to validate are the analysis by classical microbiology, which is described in the ISO standards, and by the automated method TEMPO (bioMérieux), based on the most probable number (MPN) method. The validation was performed to five food matrices of the type fresh meat, meat product and/or prepared food. The validation parameters were precision and accuracy under repeatability and reproducibility conditions. Under reproducibility conditions uncertainty was also calculated, allowing comparison between results obtained in each method for each microbiological parameter. Under

both experimental conditions and in both analytical methods the precision and accuracy parameters previously set were met, independently of microbiological parameter. The uncertainty obtained was higher in TEMPO analysis than classical microbiology method, which is consistent with expectations due to the nature of TEMPO system. Following the results obtained it is concluded that both analytical methods are valid for the analysis of the three microbiological parameters in the validated food matrices.

1. INTRODUCCIÓN

Tal y como recoge en su página web, ASINCAR es una entidad sin ánimo de lucro con el objetivo de ser un organismo de apoyo y representación del sector cárnico asturiano, reconocido como Centro Tecnológico Agroalimentario de referencia por el Ministerio de Economía y Competitividad, y como Agrupación Empresarial Innovadora (AEI) Excelente por el Ministerio de Industria, Energía y Turismo. Como queda patente, no sólo representa al sector, sino que también ofrece a sus asociados una serie de servicios de alto valor añadido, como el envío de información de aspectos de interés para el sector, desarrollo de jornadas técnicas y de nuevas tecnologías y servicios de asesoramiento y representación; así mismo lleva a cabo una serie de actividades que le hacen centro de referencia en el Principado de Asturias, sobre todo en lo respectivo al Laboratorio y a su actividad en I+D+i. Las actividades realizadas en su Laboratorio pueden agruparse en: análisis microbiológicos, análisis físico-químicos, análisis de agua y análisis de superficies, siendo diversas las actividades dentro de cada grupo. Debido a la naturaleza del presente trabajo de Fin de Máster las actividades de mayor interés fueron las relacionadas con los análisis microbiológicos, en muchas de las cuales se emplean los métodos de recuento objeto de la validación realizada.

El correcto control microbiológico en todos los niveles de la Industria Alimentaria es vital debido a la importancia que ésta juega en la salud humana. Tal y como queda recogido en el Reglamento 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicable a los productos alimenticios: “Los productos alimenticios no deben contener microorganismos ni sus toxinas o metabolitos en cantidades que supongan un riesgo inaceptable para la salud humana [...] La seguridad de los productos alimenticios se garantiza principalmente mediante un enfoque preventivo, como la adopción de buenas prácticas de higiene y la aplicación de procedimientos basados en los principios APPCC (Análisis de Peligros y Puntos Críticos) [...] Los explotadores de las empresas alimentarias velarán por que los productos alimenticios cumplan los criterios microbiológicos pertinentes. A tal fin, en cada fase de producción, transformación y distribución de alimentos, incluida la venta al por menor, los explotadores de las empresas alimentarias adoptarán medidas, como parte de sus procedimientos basados

en APPCC y la aplicación de buenas prácticas de higiene [...]” Por lo tanto queda clara la obligación de las Industrias alimentarias de realizar controles microbiológicos que aseguren la calidad microbiológica de sus alimentos, procesos, superficies y trabajadores, entre otros. Estos controles pueden ser realizados por laboratorios de control de calidad pertenecientes a las propias empresas o bien por laboratorios externos cualificados para ello, como es el caso del laboratorio de ASINCAR.

El Laboratorio de microbiología de ASINCAR combina en su análisis tanto métodos de microbiología clásica, considerados por ISO como métodos de referencia, como métodos automatizados, que disminuyen el tiempo necesario hasta la obtención de los resultados y son más sencillos de realizar en cuanto a materiales, tareas del analista y espacio empleado, así como la automatización de la trazabilidad de las muestras. Aunque la validación de los métodos analíticos es siempre recomendable no siempre es obligatoria, depende del tipo de método (normalizado o no) o si se trata de un método automatizado ya acreditado por una agencia de reconocimiento internacional (como en el caso de los sistemas automatizados de bioMérieux); sin embargo la validación de cualquier método analítico siempre es obligatoria para su acreditación. La validación de un método analítico es la prueba escrita de la capacidad técnica del laboratorio para realizar dicho análisis, así como la demostración de la fiabilidad de los resultados obtenidos, siempre siguiendo la normativa asociada.

El objetivo del presente Trabajo de Fin de Máster es la realización del proceso de validación de tres parámetros microbiológicos, analizados en unas determinadas matrices alimentarias y por dos métodos analíticos distintos: microbiología clásica y el sistema automatizado TEMPO, con el objetivo de, en un futuro, acreditar el análisis de dichos parámetros por los dos métodos. A tal fin se realiza el cálculo estadístico asociado a la validación, así como la determinación la incertidumbre expandida de cada uno de ellos, siguiendo en todo momento la normativa ISO asociada al proceso.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

2.1 Validación de un método analítico

El concepto de validación se puede definir como: “Proceso de evaluación de las características de un procedimiento de medida, y comprobación de que dichas características cumplen una serie de requisitos preestablecidos para el uso específico previsto”, es decir, el objetivo de la validación es confirmar que el método analítico o de medida empleado es adecuado para el uso previsto que se le va a dar. La validación incluye la especificación de los requisitos que ha de cumplir el método a validar, la determinación de las características del método, la comprobación de que se satisfacen los requisitos predeterminados utilizando el método y la declaración sobre la validez del método, llevando en todo momento un registro de validación que recoja los pasos seguidos y los resultados obtenidos. Para demostrar la validez de un método existen una serie de parámetros cuyo cumplimiento es preciso determinar durante el proceso de validación; dichos parámetros dependerán del tipo de método que se valida, siendo los establecidos en el caso de métodos microbiológicos los siguientes [1]:

Exactitud: Se entiende por tal al grado de concordancia entre el resultado de la medición y el valor de referencia aceptado. En microbiología, teniendo en cuenta la dificultad para obtener el valor de referencia, se emplea el término de exactitud relativa: Grado de correspondencia entre la respuesta obtenida por el método de referencia y la respuesta obtenida por un método alternativo en muestras similares.

Precisión: Se trata del grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento experimental repetidas veces bajo las condiciones establecidas. Dentro de este parámetro se engloban la repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad es la el grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones del mismo mensurado realizadas en las mismas condiciones de medición (mismo método, mismo analista, mismo instrumento de medida); la reproducibilidad es el grado de concordancia entre los resultados de mediciones del mismo mensurando realizadas bajo diferentes condiciones de medición (diferentes analistas, diferentes días, bajo diferentes condiciones, etc.) [2].

Incertidumbre: Es la estimación que caracteriza el intervalo de valores en el que se sitúa, generalmente con una alta probabilidad, el valor verdadero de la magnitud medida. La incertidumbre de la medida incluye, en general, varias componentes. Algunas pueden estimarse a partir de la distribución estadística de los resultados de series de medición y pueden caracterizarse por la desviación típica muestral, las estimaciones de los otros componentes solamente pueden basarse en la experiencia o en otras informaciones. El cálculo de la incertidumbre se obtiene como resultado del propio proceso de validación.

2.2 Validación en microbiología

La necesidad de validación de métodos microbiológicos ha ido en aumento a lo largo de los años, por lo que existen diversas normas y notas técnicas publicadas dentro de ISO para orientar y concretar más la validación en este campo [1]; entre ellas cabe destacar la norma “ISO 19036: Microbiología de alimentos y piensos-Guía para la estimación de la incertidumbre para determinaciones cuantitativas”, que se verá un poco más detalladamente en el apartado de Legislación.

Los métodos analíticos se pueden clasificar en normalizados y no normalizados. Se entiende por método normalizado aquel apropiado para el ensayo dentro de su alcance, desarrollado por organismos de normalización internacional, nacional o regional, o por organizaciones reconocidas en diferentes ámbitos y aceptadas por el sector técnico en cuestión. Dentro de los no normalizados se encuentran los métodos alternativos (o no normalizados) y los métodos normalizados que presentan alguna modificación en su alcance [1]. La validación es obligatoria en el caso de los métodos no normalizados, pero no en los normalizados; no obstante cuando se desea acreditar un método analítico es necesaria su validación independientemente del tipo del que se trate, ya que el laboratorio ha de demostrar su capacidad técnica para llevarlo a cabo. En el presente proyecto se validan tanto los métodos normalizados (microbiología clásica), como el alternativo (TEMPO) a fin de, en un futuro, acreditar ambos para el análisis de tres parámetros microbiológicos de interés: aerobios mesófilos, Enterobacterias y *E. coli* para unas matrices alimentarias concretas. En el caso concreto de TEMPO, se trata de un método analítico automatizado validado por AFNOR

(Association Française de Normalisation), como acreditan los certificados de validación BIO 12/15-09/05, BIO 12/21-12/06 y BIO 12/13-02/05 (aerobios mesófilos, Enterobacterias y *E. coli* respectivamente), por lo que se podría decir que se trata de un método no normalizado especial dentro de su categoría.

Al igual que en la validación de cualquier método analítico, todo el proceso ha de reflejar las condiciones reales del ensayo. En el caso de ensayos microbiológicos se puede trabajar con muestras contaminadas naturalmente o de manera artificial mediante inoculación con un nivel conocido de microorganismos, siendo esta última la opción menos recomendable, puesto que imita de manera superficial la presencia de contaminantes naturales. No obstante en numerosas ocasiones es la mejor y la única manera posible, sobre todo como en validaciones como la planteada en la que es necesario determinar el porcentaje de recuperación, y, por tanto, es preciso conocer la concentración inicial de microorganismos de la que se parte en la muestra para su cálculo [2].

2.3 Aerobios mesófilos (AM), Enterobacterias (EB) y *Escherichia coli* (EC)

A continuación se recogen las principales características de los tres indicadores microbiológicos cuya detección y cuantificación es objetivo del proceso de validación llevado a cabo.

2.3.1 Microbiología e indicadores

Aerobios mesófilos:

También denominados viables totales. Este indicador microbiológico se emplea con el objetivo de estimar el nivel de microorganismos de un producto alimenticio y determinar su estado higiénico general. Se tratan de microorganismos que crecen en presencia de oxígeno y cuya temperatura óptima de crecimiento está entre 15-35 °C. Dentro de aerobios mesófilos se incluyen tanto bacterias como hongos y levaduras [3].

Enterobacterias:

Constituyen un grupo grande y heterogéneo de bacterias gram-negativas, entre las que se encuentra *Salmonella spp* y *E. coli*, y que reciben su nombre por hallarse habitualmente localizadas en el tubo digestivo. A pesar de ello se tratan de microorganismos ubicuos que pueden encontrarse de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del ser humano [4]. En los alimentos frescos o de origen animal las Enterobacterias son un buen indicador de la calidad de los mismos y su presencia en número elevado puede indicar una contaminación de las materias primas, equipos sucios o contaminados, incorrecta manipulación del alimento, contaminación posterior al tratamiento y/o un almacenamiento inadecuado.

E. coli:

Se trata de una enterobacteria, por lo que presenta las características generales vistas en el punto anterior. Aunque la mayoría de las diferentes cepas de *E. coli* no se consideran patógenas, e incluso son necesarias para mantener la salud del tracto intestinal, algunas cepas pueden actuar como patógenos oportunistas y causar infecciones en personas inmunodeprimidas. Así mismo, existen cepas patógenas que, al ser ingeridas, causan gastroenteritis en personas sanas. La presencia de *E. coli* en alimentos o agua está aceptada como indicador de contaminación fecal reciente y la posible presencia de otros patógenos de naturaleza entérica [5].

2.3.2 Determinación de los indicadores y niveles permitidos

Los límites máximos y mínimos para cada uno de los tres parámetros microbiológicos contemplados en la validación están recogidos en el Reglamento (CE) Nº 2073/2005, y en su posterior modificación Reglamento (CE) Nº 1441/2007, en función del tipo de alimento tratado. De igual manera la norma recoge qué tipo de indicador microbiológico debe analizarse en función del tipo de alimento, así como el método analítico normalizado existente para cada uno de ellos. En la tabla contenida en el Anexo I se reflejan los límites estipulados de los tres parámetros microbiológicos a validar para el caso concreto de productos cárnicos y platos preparados, los cuales

suponen una parte importante de las muestras analizadas en el laboratorio y es el grupo al que pertenecen las matrices empleadas en el proceso de validación.

2.4 Método de microbiología clásica: Siembra por inclusión y recuento en placa

En el laboratorio de control de calidad de ASINCAR, para la determinación y cuantificación de los parámetros microbiológicos vistos anteriormente, se realizan recuentos en medio sólido utilizando la técnica de recuento en placa mediante siembra por inclusión, el cual está recogido en los reglamentos europeos (CE) Nº2073/2005 y Nº 1441/2007, vistos en el apartado Legislación. El recuento en medio sólido se basa en la capacidad de muchos microorganismos de producir colonias dentro o sobre la superficie de los medios de agar, reconociéndose a simple vista o mediante el uso de una lupa. Para la siembra por inclusión se realiza previamente el banco de diluciones decimales hasta llegar a las diluciones deseadas, se pipetea 1 mililitro de la dilución a sembrar y se inocula en la placa petri correspondiente. A continuación se vierte sobre cada placa petri el medio de agar fundido, selectivo para el parámetro a determinar, y se mezclan con suavidad medio e inóculo para conseguir una distribución homogénea del microorganismo: cuatro veces con movimientos circulares en sentido contrario a las agujas del reloj, cuatro veces en sentido de las agujas del reloj, dos veces hacia adelante y hacia atrás y dos veces de izquierda a derecha. Se deja enfriar y solidificar colocando la placa petri sobre una superficie horizontal fría y se incuba siguiendo las indicaciones establecidas para cada parámetro [6]. Transcurrido el tiempo de incubación se procede al recuento de las colonias en aquellas placas en las que el número de unidades formadoras de colonia (ufc) se encuentre entre 30 y 300, tal y como establece la norma ISO correspondiente (ISO 7218:2007).

2.5 TEMPO

Es un sistema automático para el recuento de microorganismos indicadores de calidad en un rango de tiempo de 24-48 horas de incubación, dependiendo del test realizado, en productos alimenticios a excepción de bebidas, leche cruda y piensos. El equipo va acompañado de un programa informático que gestiona las muestras analizadas, así

como los tiempos de incubación, la trazabilidad de las muestras, las posibles incidencias en los análisis y los resultados obtenidos.

2.5.1 Fundamento

El TEMPO es un sistema automático miniaturizado de recuento de microorganismos indicadores de calidad, concretamente aerobios mesófilos, Enterobacterias, coliformes totales, *E. coli*, *S. aureus*, bacterias ácido-lácticas, mohos y levaduras, basado en el método del número más probable (NMP). El principio del método NMP es el de favorecer el crecimiento del microorganismo objeto de detección bajo las condiciones adecuadas, empleando para ello un mínimo de tres diluciones y tres tubos por dilución [7]. La realización del método implica aceptar que: 1) Los microorganismos se distribuyen de manera aleatoria en la muestra, 2) Los microorganismos están presentes como entidades individuales, no como cadenas, parejas o grupos, y no se repelen unos a otros, 3) Cada tubo cuyo inóculo contenga al menos un microorganismo viable producirá un crecimiento o cambio en el medio detectable (turbidez del medio) y 4) Todos los tubos son independientes entre sí. El método del NMP consiste en realizar un grado de diluciones de la muestra homogeneizada de manera que la suspensión inoculada en cada tubo no siempre contenga microorganismos viables [8]. A medida que aumenta el factor de dilución se alcanzará un punto en el que no todos los tubos presentan crecimiento, lo que indica que en ellos el inóculo no contenía ninguna célula viable. El número de tubos positivos por cada dilución se combina para determinar, por medio de una fórmula matemática, el número más probable de microorganismos por mililitro o gramo de muestra (ufc/ml o ufc/g). El sistema TEMPO miniaturiza el método del NMP utilizando unas tarjetas desechables en las que se realizan 16 tubos de incubación por cada uno de los tres niveles de dilución, lo que disminuye el error estadístico.

2.5.2 Funcionamiento

El equipo TEMPO (fig. 1) puede ser descompuesto en los siguientes elementos [7]:

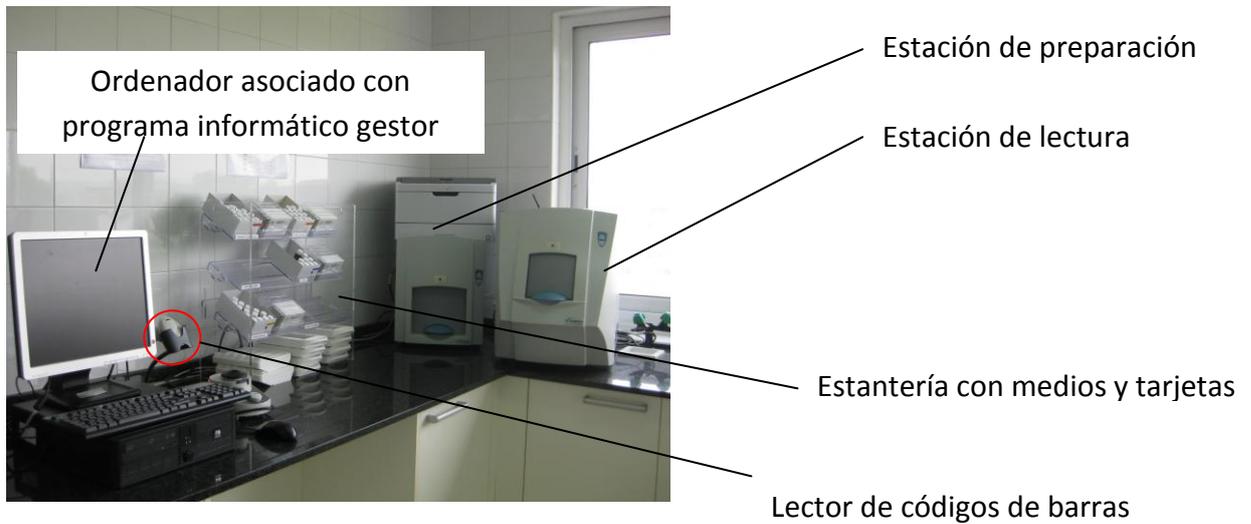


Fig 1. Componentes del equipo TEMPO

- Medios de cultivo:

Los medios de cultivo contienen un indicador fluorescente y vienen en formato polvo dentro de un vial opaco. Cada vial contiene el medio selectivo para el parámetro microbiológico a analizar, y es reconstituido con el volumen adecuado de agua estéril y muestra. Al igual que las tarjetas, cada vial está codificado mediante un código de barras que permite, entre otras cosas, asociar el medio a su tarjeta correspondiente y garantizar la trazabilidad.



Fig. 2. Vial con el medio de cultivo. El código de barras se asocia en el programa informático con el código de la tarjeta correspondiente, asegurando una completa trazabilidad de todo el proceso y de los distintos componentes.

- Tarjetas:

La tarjeta consiste en un dispositivo plástico con una película de sellado y un tubo de transferencia, a través del que se aspira el medio (fig. 3). Cuenta con diferentes pocillos, agrupados según dilución, que son las zonas de reacción en las que se produce la detección del crecimiento microbiano mediante fluorescencia: durante la incubación el microorganismo presente reduce el sustrato del medio de cultivo, causando la aparición de la señal fluorescente que es detectada por la estación de lectura; en las tarjetas para el recuento de Enterobacterias el principio de funcionamiento es inverso, existe una fluorescencia inicial que se suprime cuando la bacteria metaboliza el sustrato del medio de cultivo [9]. Los pocillos se dividen en tres grupos, de 16 pocillos cada uno, con un logaritmo de diferencia en volumen entre cada uno; dependiendo del número y tamaño de los pocillos positivos el programa informático de TEMPO infiere el número de microorganismo presentes en la muestra basándose en el NMP [10]. Cada tarjeta dispone de un código de barras que codifica un número de identificación único para cada tarjeta, que permite identificar el tipo de parámetro que se analiza, asociar cada tarjeta a un medio de cultivo, seleccionar el tiempo y la temperatura de incubación y otros datos adicionales.



Fig. 3. Tarjeta de TEMPO, componente innovador y pieza angular del sistema

- Estación de preparación:

La estación de preparación está compuesta principalmente por la unidad de llenado, en la que se realiza la aspiración del medio de cultivo inoculado y el sellado de las tarjetas. Para ello se disponen las tarjetas con sus medios correspondientes en la gradilla de llenado (fig. 4-A) y se introducen en la unidad de llenado, que automáticamente realiza todo el proceso, indicando la finalización mediante señales sonoras. A continuación se colocan las tarjetas ya selladas en la gradilla de incubación (fig.4-B) y se incuban bajo las condiciones estipuladas para cada test.

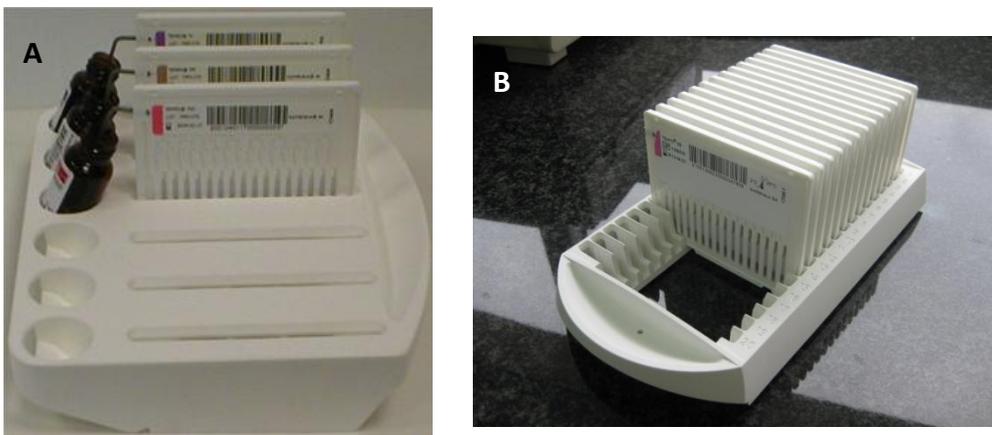


Fig. 4-A. Gradilla de llenado con las tarjetas asociadas a sus medios selectivos. **4-B.** Gradilla de incubación y lectura.

- Estación de lectura:

En la estación de lectura se lleva a cabo la lectura de las tarjetas una vez transcurrido el tiempo de incubación estipulado para cada test. La lectura de las tarjetas es independiente, de manera que en una misma gradilla se pueden leer tarjetas correspondientes a diferentes test.

En el proceso de análisis de muestras por TEMPO se sigue el siguiente protocolo:

1. Se escanea el código de barras del vial con medio.
2. Se dosifica el volumen de agua estéril y se inocula el volumen de muestra estipulado para el tipo de dilución inicial de la que se quiere partir (1/4, 1/40, 1/400 o 1/4000). Se agita el vial durante unos 3 segundos en un agitador tipo vórtex.

3. Se escanea el código de barras de la tarjeta correspondiente al test que se va a realizar y se coloca en la gradilla de llenado, asegurando que el tubo de transferencia está completamente dentro del vial.
4. Se introduce la gradilla de llenado en la unidad de llenado y se inicia el proceso de aspiración de medio y sellado. Una vez finalizado el proceso es aconsejable comprobar que todos los viales están vacíos y que el tubo de transferencia está correctamente cortado y sellado.
5. Se transfieren las tarjetas a la gradilla de incubación y se incuban siguiendo las recomendaciones especificadas para cada test.
6. Para la lectura de las tarjetas se introduce la gradilla de incubación en la estación de lectura.

3. LEGISLACIÓN Y NORMATIVA

La industria alimentaria, como productora de alimentos de consumo, juega un papel muy importante en la salud humana. Por esta razón se trata de una industria regida por numerosas normas y directrices que abarcan cada uno de los distintos ámbitos de la industria, desde la cría de animales hasta el muestreo que ha de realizarse para el control de calidad de los productos, incluyendo los límites establecidos para cada parámetro medido. Este control normativo no sólo se aplica a los centros productores, sino también a los laboratorios, pertenecientes o no al centro productor, en los que se llevan a cabo, entre otros, los controles de los productos terminados, materias primas y/o análisis de ambiente y superficies. En el presente apartado se recogen las principales normas y legislación de aplicación en laboratorio de análisis microbiológico, tanto en su actividad de rutina como en los procesos de validación, así como aquella más específica para el análisis de los parámetros microbiológicos contemplados en el presente proyecto. Es importante diferenciar entre legislación y normativa. En el primer caso el cumplimiento de la legislación es obligatorio, mientras que el seguimiento de la normativa es opcional por parte del laboratorio, que decide si quiere o no trabajar bajo las normas ISO correspondientes.

3.1 Legislación

Reglamento (CE) Nº 2073/2005, Relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y su posterior modificación, Reglamento (CE) Nº 1441/2007).

Ambos reglamentos establecen los límites microbiológicos en función del tipo de alimento (como los recogidos en el Anexo I) y las normas de aplicación que deben cumplir los explotadores de empresas alimentarias al aplicar las medidas de higiene generales y específicas contempladas en el artículo 4 del Reglamento (CE) Nº 852/2004 (Relativo a la higiene de los productos alimenticios) [11].

3.2 Normativa

ISO 17025:2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

Esta norma establece los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos o calibraciones, incluido el muestreo. Cubre los ensayos y las calibraciones que se realizan utilizando métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos desarrollados por el propio laboratorio. Es aplicable a todos los laboratorios independientemente del número de empleados o de la extensión de sus actividades [12].

ISO/TS 19036. Directrices para la estimación de la incertidumbre de medidas en determinaciones cuantitativas.

Esta especificación técnica sirve de orientación para el cálculo y expresión de la medida de incertidumbre asociada a los resultados cuantitativos en microbiología de alimentos. Es aplicable a análisis cuantitativos de 1) productos para consumo humano y de alimentación de animales y 2) muestras ambientales en el área de producción y manejo de alimentos, llevados a cabo mediante la enumeración de microorganismos usando la técnica de recuento en placa, siendo también aplicable a análisis cuantitativos mediante métodos instrumentales alternativos. Esta especificación técnica no es aplicable a la enumeración usando la técnica del número más probable ni para el análisis de bajos niveles de microorganismos [13]. No obstante sí puede emplearse para el cálculo de la incertidumbre de los resultados obtenidos mediante

TEMPO ya que, aunque se basa en la técnica NMP, el número de repeticiones por nivel de dilución es mucho más elevado que el de la técnica NMP clásica y el error estadístico mucho menor.

ISO 7218:2007. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico.

Esta es la norma de referencia para cualquier laboratorio de análisis microbiológico y la más importante en este aspecto. Esta norma internacional indica los requisitos generales y ofrece una guía orientativa con tres objetivos principales: 1) Implementación de las Normas del Subcomité ISO/TC 34/SC 9 o del Subcomité ISO/TC 34/SC 5 para la detección o el recuento de los microorganismos, 2) Establecer las buenas prácticas de laboratorio en los laboratorios de microbiología de los alimentos y 3) Ser una guía orientativa para la acreditación de los laboratorios de microbiología de los alimentos. Abarca el análisis de bacterias, levaduras y mohos, pero no cubre el análisis de toxinas u otros metabolitos de los microorganismos. Su objeto es el de ayudar a asegurar la validez de los análisis microbiológicos de los alimentos, colaborar en la aseguración de que las técnicas generales que se utilizan para realizar dichos análisis sean las mismas en todos los laboratorios, ayudar a conseguir unos resultados homogéneos en todos los laboratorios y contribuir a la seguridad del personal del laboratorio previniendo los riesgos de que se produzcan infecciones [6].

ISO 16649-2:2001, ISO 4833:2003 e ISO 21528-2:2004 de Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal.

ISO 4833. Método horizontal para el recuento de microorganismos- Técnica de recuento de colonias a 30°C: Esta norma internacional especifica un método horizontal para el recuento de microorganismos, contando las colonias que crecen en un medio sólido después de la incubación aeróbica a 30°C. Es aplicable a los productos destinados al consumo humano o animal [14].

ISO 21528-2. Método horizontal para la detección y enumeración de Enterobacterias- Parte 2: Método de recuento en placa: Describe un método sin enriquecimiento previo para la enumeración de Enterobacterias. Es aplicable a productos para consumo humano y alimentación animal, así como muestras ambientales en el área de producción y manejo de productos alimentarios. La enumeración se lleva a cabo

mediante el recuento en placa de colonias en medio sólido específico tras una incubación a 37°C [15].

ISO 16649-2: Método horizontal para la enumeración de *E. coli* beta-glucuronidasa positiva: Esta parte de la ISO define un método horizontal para el recuento de *E. coli* β -glucuronidasa positiva en alimentos para consumo humano y animal. Se emplea una técnica de recuento de colonias tras una incubación a 44°C en medio sólido TBX que contiene un ingrediente cromogénico para la detección de la enzima β -glucuronidasa [16].

4. OBJETIVO DEL PROYECTO

Dentro de este apartado se diferencian dos tipos de objetivos: objetivo principal, razón del presente Trabajo Fin de Máster, y objetivos secundarios, que derivan del propio proceso de validación y de la actividad diaria del laboratorio.

- **Objetivo principal:**

- Validación de tres parámetros microbiológicos (Aerobios mesófilos, Enterobacterias y *E. coli*) mediante microbiología clásica y sistema automatizado TEMPO. Para ello es preciso:
 - Calcular la incertidumbre asociada a cada método bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.
 - Cumplir la normativa ISO asociada a la validación y cálculo de incertidumbre para una futura acreditación.

- **Objetivos secundarios:**

- Conocer la naturaleza de un proceso de validación, incluyendo aspectos normativos y técnicos.
- Conocer la actividad diaria de un laboratorio de análisis acreditado perteneciente a una empresa privada
- Requisitos legales y normativos asociados a la propia actividad de un laboratorio acreditado.
- Objetivo, uso y determinación de los parámetros microbiológicos a analizar.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Planificación de la validación

Como se ha visto en apartados anteriores, durante la validación del ensayo es preciso determinar, entre otros parámetros, la repetibilidad y reproducibilidad del mismo. Para ello se realizaron dos pruebas de validación en diferentes días, planificándose de la siguiente de la siguiente manera: para la repetibilidad del ensayo se realizaron duplicados del mismo mensurado, siendo el análisis realizado por el mismo analista, el mismo día y bajo las mismas condiciones; para determinar la reproducibilidad se realizó el mismo proceso pero en distinto día y por diferente analista, lo que cambia las condiciones de análisis. Dentro de cada ensayo, el análisis mediante microbiología clásica y mediante TEMPO fue realizado en paralelo; por lo tanto se identifican dos pruebas, Prueba 1 y Prueba 2 (para las condiciones de reproducibilidad) y dos grupos de duplicados: A y B en la Prueba 1 y C y D en la Prueba 2 (para las condiciones de repetibilidad).

5.2 Matrices, equipos, medios de cultivo y cepas

Matrices:

El proceso de validación se realizó empleando cinco matrices alimentarias cárnicas y platos preparados, representativas de los diferentes tipos de muestras de esta clase que son tratadas en el laboratorio de control de calidad. Antes del inicio del proceso de validación dichas matrices fueron codificadas numéricamente (Tabla 1) y esterilizadas en autoclave (Autoclave 75L, Presoclavell de Selecta) a 121°C durante 15 minutos, para eliminar la flora microbiana natural y conocer con exactitud el número de microorganismos inoculados; hasta su utilización fueron siendo conservadas a -20°C.

Tipo de matriz	Producto	Código
Producto cárnico cocido	Lacón cocido	672
Producto cárnico crudo-curado	Longaniza extra	673
Carne fresca	Filete de potro	675
Plato preparado (Lata)	Fabada	698
Producto cárnico crudo-curado	Morcilla	887

Tabla 1. Tipo de matriz y código asociado

Equipos

Los equipos empleados durante el desarrollo de la validación, así como su codificación correspondiente, se recogen en el siguiente listado:

- Homogeneizador mecánico Stomacher: MB-Thm-001
- Estufa 37°C: MB-Est-005
- Estufa 44°C: MB-Est-001
- Estufa 30°C: MB-Est-006
- Estufa 35°C: MB-Est-004
- Diluidor: MB-Dil-001
- Espectrofotómetro: FQ-Espec-002
- Campana de flujo: MB-Cbfl-002
- Campana seguridad biológica: MB-Csb-002

Medios de cultivo

- Medio Baird-Parker: Selectivo para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*.
- Medio Tryptic Soy Broth (TSB): Para el enriquecimiento y cultivo de microorganismos aerobios no exigentes en exceso.
- Medio Plate Count Agar (PCA): Para el recuento de aerobios mesófilos totales.
- Medio Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX): Para la detección y cuantificación selectiva de *E. coli*.
- Medio Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG): Medio selectivo para la identificación y cuantificación de Enterobacterias.
- Medio Tryptone Soya Agar (TSA): Medio de uso general para el crecimiento tanto de microorganismos exigentes como no exigentes.
- Agua de peptona (PW): Para el procesado de las matrices y la realización de las diluciones decimales.
- Medio TEMPO TVC: para el recuento de aerobios mesófilos.
- Medio TEMPO EB: para el recuento de Enterobacterias.
- Medio TEMPO EC: para el recuento de *E. coli*.

Cepas

- Cepa *Bacillus subtilis* CECT 356
- Cepa *Escherichia coli* CECT 434
- Cepa *Staphylococcus aureus* CECT 435

5.3 Inóculo

El día anterior a la realización del proceso de validación se realizó un cultivo “overnight”, o cultivo fresco, de las tres cepas bacterianas que forman el cóctel bacteriano empleado para el dopaje de las matrices, *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus*. Para ello se resuspendió cada cepa en medio líquido TSB y se dejaron incubar durante la noche a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Estandarización del inóculo

Para la estandarización del inóculo se partió del dato determinado previamente por el laboratorio de que en una suspensión bacteriana de las cepas empleadas, para una absorbancia de 0.500 bajo una longitud de onda de 550 nm, se corresponde con una concentración de orden de magnitud de 10^8 ufc/ml (unidades formadoras de colonia/ml).

Titulación del inóculo

Para comprobar el orden de magnitud final de los inóculos se llevó a cabo la titulación del inóculo mediante siembra por inclusión 5 placas de cada una de las tres diluciones bacterianas consecutivas seleccionadas. Las placas fueron incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 72 ± 3 horas.

5.4 Cóctel bacteriano

Para la obtención del cóctel bacteriano con el que se doparon las matrices alimentarias se mezclaron 3 ml de cada una de las cepas estandarizadas y se realizaron diluciones decimales tanto para el dopaje de las matrices como para la titulación del cóctel.

Titulación del cóctel

La titulación del cóctel bacteriano se realizó con el fin de determinar la concentración final de las tres cepas bacterianas una vez mezclados los 3 ml de cada una de ellas, y comprobar si se corresponde con el orden de magnitud esperado. Para ello se realizaron siembras en placa en medios de cultivo generales y/o diferenciales para cada microorganismo. En el caso de aerobios mesófilos y *E. coli* se sembraron por inclusión en medio PCA y TBX 5 placas de cada dilución con $1 \text{ ml} \pm 0.005 \text{ ml}$ del cóctel bacteriano; las placas se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 72 ± 3 horas en el caso de aerobios mesófilos y a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas para *E. coli*. Para *S. aureus* se sembraron en superficie en medio B-P las diluciones consecutivas, sembrando cinco placas de cada dilución con $100 \mu\text{l}$; las placas se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 2 horas.

5.5 Preparación y dopaje de matrices

Cada matriz fue procesada por duplicado con el fin de determinar la repetibilidad y reproducibilidad del ensayo, para ello se codificaron como A y B los duplicados del primer ensayo y como C y D los del segundo. Se pesaron $10 \pm 0,10$ gramos de matriz en el diluidor automático (Dilumat 3 mk2, AES laboratorio) y se diluyeron en 90 ml de agua de peptona (o la proporción necesaria para obtener la dilución 1:10). A continuación se doparon las matrices y se procedió a la homogeneización mecánica del conjunto en el triturador homogeneizador mecánico (IUL Instruments), durante 2 minutos, obteniéndose así la dilución madre 1:10 a partir de la cual se realizan los distintos métodos analíticos.

5.6 Análisis de matrices

Los dos ensayos se realizaron en paralelo, de manera que de la misma bolsa homogeneizada se tomaron los volúmenes necesarios tanto para el método de cultivo mediante microbiología clásica como para TEMPO.

TEMPO

Para los tres parámetros se realizó la dilución 1:400, inoculándose 100 µl de la dilución madre y 3,9 ml de agua destilada estéril en el medio liofilizado selectivo para cada parámetro. El proceso de preparación y lectura de las tarjetas es el recogido en el apartado correspondiente a funcionamiento del TEMPO, dentro de las consideraciones teóricas y experimentales. Las tarjetas fueron incubadas según lo indicado por el fabricante:

- TVC: 30°C 40-48 h
- EB: 35°C 22-27 h
- EC: 37°C 22/24-27 h

Microbiología clásica

Para el recuento por microbiología clásica se sembró por inclusión 1 ml ± 0.005 ml de tres diluciones consecutivas (diluciones 1:10) en medio selectivo para cada parámetro a determinar: PCA para aerobios mesófilos, VRBG para Enterobacterias y TBX para *E. coli*. Las condiciones de incubación para cada parámetro fueron:

- AM: 30°C ± 1°C 72 ± 3 h
- EB: 37°C ± 1°C 24 ± 2 h
- EC: 44°C ± 1°C 24 ± 3 h

6. CÁLCULO ESTADÍSTICO

Los parámetros estadísticos a determinar durante la validación se estudian bajo condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad, determinando si se cumplen o no estas máximas.

Los datos obtenidos como ufc/g o ufc/ml siguen una distribución asimétrica, por lo que es necesaria una normalización previa a fin de realizar el tratamiento estadístico pertinente. Para ello se transforman los datos ufc/g a logaritmo en base 10, (\log_{10} ufc/g).

6.1 Condiciones de repetibilidad

Para determinar la repetibilidad se calculan los parámetros estadísticos para cada una de las dos pruebas realizadas en cada uno de los tres parámetros microbiológicos, obteniéndose pares de datos en cada uno.

Exactitud

La exactitud, de los métodos se determinó mediante el porcentaje de recuperación, es decir, mediante el número de microorganismos que se recuentan en placa y TEMPO en comparación con los inoculados artificialmente con el cóctel bacteriano, denominado “Valor de Referencia” y obtenido a partir de los recuentos resultantes en la titulación del cóctel. Para ello se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación \%} = \frac{\text{Recuento obtenido}}{\text{Valor de referencia}} \times 100$$

Se calculó la recuperación para cada muestra analizada, empleando el promedio de los duplicados, y se obtuvo la recuperación global de la prueba por parámetro. Para que el método sea considerado exacto ha de cumplirse que el porcentaje de recuperación se encuentre ente 70 y 120 %.

Precisión

Para el cálculo de la precisión se calcula el coeficiente de variación (CV) en porcentaje, utilizando la siguiente fórmula:

$$CV \% = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$$

donde \bar{x} es el promedio global de los recuentos obtenidos en cada prueba y S_r es la desviación estándar de repetibilidad, calculada como sigue:

$$S_r = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(Y_{iA} - Y_{iB})^2}{2}}$$

donde y_{iA} e y_{iB} son los resultados obtenidos en el recuento de la serie A y la serie B para cada muestra de la prueba 1, y de la serie C y D para cada muestra de la serie 2.

Bajo condiciones de repetibilidad el CV para recuentos inferiores o iguales a 1000 ufc/g debe ser inferior o igual a 20%, calculado en escala logarítmica, e inferior o igual a 15% para recuentos superiores a 1000 ufc/g.

6.2 Condiciones de reproducibilidad

Para determinar la reproducibilidad se calculan los parámetros de la misma manera vista en el apartado anterior, pero en este caso los valores con los que se trabajan son los promedios de los recuentos obtenidos en cada una de las dos pruebas realizadas, es decir, el promedio de la prueba 1 y de la prueba 2. En condiciones de reproducibilidad también se calcula la incertidumbre, que permitirá comparar los métodos analíticos para cada parámetro y determinar cuál tiene mayor incertidumbre.

Exactitud

El valor de referencia se obtiene calculando el promedio de los valores de referencia obtenidos para cada prueba por separado. El recuento promedio hace referencia a la media de las medias de los recuentos obtenidos en cada prueba.

$$\text{Recuperación \%} = \frac{\text{Recuento promedio obtenido}}{\text{Valor de referencia promedio}} \times 100$$

Para que el método sea considerado exacto ha de cumplirse que el porcentaje de recuperación se encuentre ente 70 y 120 %.

Precisión

$$CV \% = \frac{S_R}{\bar{x}} \times 100$$

donde \bar{x} es la media de los recuentos promedio de cada prueba y S_R es la desviación estándar de reproducibilidad, calculada como sigue:

$$S_R = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(Y_{iA} - Y_{iB})^2}{2}}$$

donde y_{iA} e y_{iB} son los promedios obtenidos en la prueba 1 (serie A y B) y la 2 (serie C y D) respectivamente.

Bajo condiciones de reproducibilidad el CV ha de ser menor o igual a 30% en recuentos inferiores o iguales a 1000 ufc/g y en recuentos superiores ha de ser igual o inferior a 20%.

Incertidumbre expandida

Tal y como recoge la ISO 19036:2006, la incertidumbre expandida (I), en el caso de recuentos altos como los de la presente memoria, se calcula como:

$$I = 2S_R$$

donde 2 es el factor de cobertura k con el que se obtiene un nivel de confianza del 95%.

La incertidumbre calculada se expresa como:

$$x \text{ ufc/g o ml} \left[10^y - \frac{10^{y-2SR}}{10^y} \%, 10^y + \frac{10^{y+2SR}}{10^y} \% \right]$$

donde y es el exponente del orden de magnitud del valor de referencia empleado para calcular la exactitud.

7. RESULTADOS

7.1 Materiales y métodos

Titulación del cóctel

En la Tabla 2 están reflejados los recuentos obtenidos de cada parámetro microbiológico durante la titulación del cóctel. Al igual que en el apartado anterior, estos datos han de ser transformados a ufc/g para cuantificar la carga microbiológica de cada uno de ellos en el cóctel y comprobar que el orden de magnitud con el que se inocularon las muestras fue el deseado.

Nº placa	PRUEBA 1		Prueba 2	
	TBX (ufc)	PCA (ufc)	TBX (ufc)	PCA (ufc)
1	$6,00 \times 10^7$	$1,70 \times 10^8$	$8,25 \times 10^7$	$1,42 \times 10^8$
2	$7,80 \times 10^7$	$1,73 \times 10^8$	$8,15 \times 10^7$	$1,52 \times 10^8$
3	$6,35 \times 10^7$	$1,54 \times 10^8$	$8,40 \times 10^7$	$1,60 \times 10^8$
4	$5,10 \times 10^7$	$1,53 \times 10^8$	$5,10 \times 10^7$	$1,78 \times 10^8$
5	$9,45 \times 10^7$	$1,60 \times 10^8$	$5,90 \times 10^7$	$1,33 \times 10^8$

Tabla 2. Ufc obtenidas en la titulación del cóctel.

7.2 Recuentos microbiológicos

Una vez eliminados los datos fuera del margen establecido para el recuento de colonias, que ha de ser entre 30 y 300, y calculado el promedio de los datos válidos en microbiología clásica, se obtuvieron los datos definitivos recogidos en las tablas 3 y 4.

7.3 Tratamiento estadístico y cálculo de la incertidumbre

7.3.1 Condiciones de repetibilidad

A continuación se exponen los datos de Precisión y Exactitud obtenidos para cada parámetro microbiológico en cada una de las dos pruebas realizadas y según método analítico empleado.

PRUEBA 1					
		Microbiología clásica		TEMPO	
Muestra	Parámetro	ufc/g	log ufc/g	TEMPO (ufc/g)	log ufc/g
673A	AM	2,16E+03	3,33	2,4E+03	3,38
	EB	8,95E+02	2,95	8,6E+02	2,93
	EC	5,15E+02	2,71	1,4E+03	3,15
673B	AM	1,51E+03	3,18	2,0E+03	3,30
	EB	9,25E+02	2,97	8,3E+02	2,92
	EC	5,05E+03	3,70	1,6E+03	3,20
672A	AM	2,20E+03	3,34	2,6E+03	3,41
	EB	1,31E+03	3,12	1,3E+03	3,11
	EC	1,51E+03	3,18	2,2E+03	3,34
672B	AM	1,46E+03	3,16	2,4E+03	3,38
	EB	1,41E+03	3,15	1,8E+03	3,26
	EC	1,64E+03	3,21	1,2E+03	3,08
675A	AM	1,94E+03	3,29	2,6E+03	3,41
	EB	7,06E+02	2,85	4,4E+02	2,64
	EC	7,56E+02	2,88	1,6E+03	3,20
675B	AM	3,89E+03	3,59	5,6E+03	3,75
	EB	1,28E+03	3,11	1,2E+03	3,08
	EC	1,38E+03	3,14	2,0E+03	3,30
698A	AM	1,87E+03	3,27	1,6E+03	3,20
	EB	1,56E+03	3,19	1,9E+03	3,28
	EC	1,27E+03	3,10	7,1E+02	2,85
698B	AM	1,26E+03	3,10	2,8E+03	3,45
	EB	1,37E+03	3,14	8,9E+02	2,95
	EC	1,44E+03	3,16	8,9E+02	2,95
887A	AM	1,72E+03	3,23	1,6E+03	3,20
	EB	7,65E+02	2,88	7,3E+02	2,86
	EC	9,61E+02	2,98	7,1E+02	2,85
887B	AM	1,48E+03	3,17	1,5E+03	3,18
	EB	1,00E+03	3,00	8,9E+02	2,95
	EC	1,11E+03	3,04	8,3E+02	2,92

PRUEBA 2					
		Microbiología clásica		TEMPO	
Muestra	Parámetro	ufc/g	log ufc/g	TEMPO (ufc/g)	log ufc/g
673C	AM	2,76E+03	3,44	6,2E+03	3,79
	EB	1,49E+03	3,17	1,7E+03	3,23
	EC	1,46E+03	3,16	4,1E+03	3,61
673D	AM	2,67E+03	3,43	6,3E+03	3,80
	EB	2,11E+03	3,32	2,1E+03	3,32
	EC	2,28E+03	3,36	3,0E+03	3,48
672C	AM	2,56E+03	3,41	4,9E+03	3,69
	EB	1,67E+03	3,22	9,9E+02	3,00
	EC	1,81E+03	3,26	1,6E+03	3,20
672D	AM	2,88E+03	3,46	2,8E+03	3,45
	EB	2,09E+03	3,32	2,2E+03	3,34
	EC	2,07E+03	3,31	1,9E+03	3,28
675C	AM	2,77E+03	3,44	2,8E+03	3,45
	EB	1,67E+03	3,22	7,1E+02	2,85
	EC	1,76E+03	3,25	1,1E+03	3,04
675D	AM	2,41E+03	3,38	3,3E+03	3,52
	EB	1,52E+03	3,18	1,8E+03	3,26
	EC	1,52E+03	3,18	1,7E+03	3,23
698C	AM	2,76E+03	3,44	3,9E+03	3,59
	EB	1,73E+03	3,24	1,8E+03	3,26
	EC	1,47E+03	3,17	1,2E+03	3,08
698D	AM	2,32E+03	3,37	6,9E+03	3,84
	EB	1,73E+03	3,24	2,2E+03	3,34
	EC	1,76E+03	3,25	1,4E+03	3,15
887C	AM	2,14E+03	3,33	2,0E+03	3,30
	EB	1,24E+03	3,09	1,6E+03	3,20
	EC	1,23E+03	3,09	8,3E+02	2,92
887D	AM	2,11E+03	3,32	2,6E+03	3,41
	EB	8,30E+02	2,92	5,7E+02	2,76
	EC	1,61E+03	3,21	2,0E+03	3,30

Tablas 3 y 4. Datos de recuento de ufc/g promedio para cada parámetro microbiológico (AM: Aerobios mesófilos, EB: Enterobacterias y EC: *E. coli*) y matriz, por microbiología clásica y TEMPO. También refleja los recuentos log de ufc/g.

Prueba 1

Aerobios mesófilos por microbiología clásica:

Como se recoge en la tabla 5, se obtuvo un CV de 4,10% y una Exactitud de 101,80%, cumpliéndose los criterios de aceptación de Precisión y Exactitud previamente establecidos (recogidos en el punto 6, Cálculo estadístico).

PRUEBA 1								
Matriz	Serie A		Serie B		Promedio	Recuperac.	SR2	SR
	ufc/g promedio	log ufc/g	ufc/g promedio	log ufc/g				
673	2,16E+03	3,33	1,51E+03	3,18	3,26	101,45	0,01	0,13
672	2,20E+03	3,34	1,46E+03	3,16	3,25	101,35	0,02	2SR
675	1,94E+03	3,29	3,89E+03	3,59	3,44	107,15	0,05	0,02
698	1,87E+03	3,27	1,26E+03	3,10	3,19	99,25	0,01	CV
887	1,72E+03	3,23	1,48E+03	3,17	3,20	99,77	0,00	4,10
					3,27	101,80	0,02	
Valor de referencia	ufc/g	log ufc/g						
	1,62E+03	3,21						

Tabla 5. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) obtenido en la Prueba 1 para el recuento de aerobios mesófilos por microbiología clásica.

Aerobios mesófilos por TEMPO:

Se obtuvo un CV de 3,97% y una Exactitud de 104,91% (tabla 6), de manera que se cumplen los criterios de aceptación para Precisión y Exactitud.

PRUEBA 1								
Matriz	Serie A		Serie B		Promedio	Recuperac.	SR2	SR
	ufc/g promedio	log ufc/g	ufc/g promedio	log ufc/g				
673	2,4E+03	3,38	2,0E+03	3,30	3,34	104,08	0,00	0,13
672	2,6E+03	3,41	2,4E+03	3,38	3,40	105,86	0,00	2SR
675	2,6E+03	3,41	5,6E+03	3,75	3,58	111,59	0,06	0,27
698	1,6E+03	3,20	2,8E+03	3,45	3,33	103,62	0,03	CV
887	1,6E+03	3,20	1,5E+03	3,18	3,19	99,40	0,00	3,97
					3,37	104,91	0,02	
Valor de referencia	ufc/g	log ufc/g						
	1,6E+03	3,21						

Tabla 6. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) obtenido en la Prueba 1 para el recuento de aerobios mesófilos por TEMPO.

Enterobacterias por microbiología clásica:

Tal y como muestra la tabla 7, se obtuvo un CV de 3,04% y una Exactitud de 106,82%. Se cumplen los criterios de aceptación para la Precisión y la Exactitud.

PRUEBA 1								
Matriz	Serie A		Serie B		Promedio	TBX		SR
	ufc/g promedio	log ufc/g	ufc/g promedio	log ufc/g		Recuperac.	SR2	
673	8,95E+02	2,95	9,25E+02	2,97	2,96	104,14	0,00	0,09
672	1,31E+03	3,12	1,41E+03	3,15	3,13	110,25	0,00	2SR
675	7,06E+02	2,85	1,28E+03	3,11	2,98	104,80	0,03	0,18
698	1,56E+03	3,19	1,37E+03	3,14	3,16	111,36	0,00	CV
887	7,65E+02	2,88	1,00E+03	3,00	2,94	103,54	0,01	3,04
					3,04	106,82	0,01	

Valor de referencia	ufc/g	log ufc/g
	6,9E+02	2,84

Tabla 7. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) obtenido en la Prueba 1 para el recuento de Enterobacterias por microbiología clásica.

Enterobacterias por TEMPO:

Como se recoge en la tabla 8, se obtuvo un CV de 6,02% y una Exactitud de 105,53%, cumpliéndose los criterios previamente establecidos para la aceptación de Precisión y Exactitud.

PRUEBA 1								
Matriz	Serie A		Serie B		Promedio	TBX		SR
	ufc/g promedio	log ufc/g	ufc/g promedio	log ufc/g		Recuperac.	SR2	
673	8,6E+02	2,93	8,3E+02	2,92	2,93	103,01	0,00	0,18
672	1,3E+03	3,11	1,8E+03	3,26	3,18	112,08	0,01	2SR
675	4,4E+02	2,64	1,2E+03	3,08	2,86	100,70	0,09	0,36
698	1,9E+03	3,28	8,9E+02	2,95	3,11	109,60	0,05	CV
887	7,3E+02	2,86	8,9E+02	2,95	2,91	102,29	0,00	6,02
					3,00	105,53	0,03	

Valor de referencia	ufc/g	log ufc/g
	6,9E+02	2,84

Tabla 8. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) obtenido en la Prueba 1 para el recuento de Enterobacterias por TEMPO.

E. coli por microbiología clásica:

Se obtuvo un CV de 10,46% y una Exactitud de 109,49% (tabla 9). Se cumplen los criterios de aceptación de la Precisión y la Exactitud.

PRUEBA 1

Matriz	Serie A		Serie B		Promedio	TBX		SR
	ufc/g promedio	log ufc/g	ufc/g promedio	log ufc/g		Recuperac.	SR2	
673	5,15E+02	2,71	5,05E+03	3,70	3,21	112,89	0,49	SR
672	1,51E+03	3,18	1,64E+03	3,21	3,20	112,46	0,00	0,33
675	7,56E+02	2,88	1,38E+03	3,14	3,01	105,87	0,03	2SR
698	1,27E+03	3,10	1,44E+03	3,16	3,13	110,17	0,00	0,65
887	9,61E+02	2,98	1,11E+03	3,04	3,01	106,04	0,00	CV
					3,11	109,49	0,11	10,46

Valor de referencia	ufc/g	log ufc/g
	6,9E+02	2,84

Tabla 9. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) obtenido en la Prueba 1 para el recuento de *E. coli* por microbiología clásica.

E. coli por TEMPO:

Tal y como muestra la tabla 10, se obtuvo un CV de 3,18% y una Exactitud de 108,57%, cumpliéndose los criterios de aceptación para Precisión y Exactitud previamente establecidos.

PRUEBA 1

Matriz	Serie A		Serie B		Promedio	TBX		SR
	ufc/g promedio	log ufc/g	ufc/g promedio	log ufc/g		Recuperac.	SR2	
673	1,4E+03	3,15	1,6E+03	3,20	3,18	111,75	0,00	SR
672	2,2E+03	3,34	1,2E+03	3,08	3,21	113,00	0,03	0,10
675	1,6E+03	3,20	2,0E+03	3,30	3,25	114,47	0,00	2SR
698	7,1E+02	2,85	8,9E+02	2,95	2,90	102,08	0,00	0,20
887	7,1E+02	2,85	8,3E+02	2,92	2,89	101,54	0,00	CV
					3,08	108,57	0,01	3,18

Valor de referencia	ufc/g	log ufc/g
	6,9E+02	2,84

Tabla 10. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) obtenido en la Prueba 1 para el recuento de *E. coli* por TEMPO.

Prueba 2

Aerobios mesófilos por microbiología clásica:

Como se recoge en la siguiente tabla (Tabla 11), se obtuvo un CV de 1,02% y una Exactitud de 106,81%, de manera que se cumplen los criterios de aceptación establecidos para Precisión y Exactitud.

PRUEBA 2									
Matriz	Serie C		Serie D		Promedio	Recuperac.	SR2	SR	
	ufc/g promedio	log ufc/g	ufc/g promedio	log ufc/g					
673	2,76E+03	3,44	2,67E+03	3,43	3,43	107,82	0,00		0,03
672	2,56E+03	3,41	2,88E+03	3,46	3,43	107,81	0,00		I
675	2,77E+03	3,44	2,41E+03	3,38	3,41	107,12	0,00		0,00
698	2,76E+03	3,44	2,32E+03	3,37	3,40	106,85	0,00		CV
887	2,14E+03	3,33	2,11E+03	3,32	3,33	104,45	0,00		1,02
					3,40	106,81	0,00		

Valor de referencia	ufc/g	log ufc/g
	1,53E+03	3,18

Tabla 11. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) obtenido en la Prueba 2 para el recuento de aerobios mesófilos por microbiología clásica.

Aerobios mesófilos por TEMPO:

En este caso se obtuvo un CV de 3,28% y una Exactitud de 112,54% (Tabla 12). Se cumplen los criterios de aceptación de Precisión y Exactitud.

PRUEBA 2									
Matriz	Serie C		Serie D		Promedio	Recuperac.	SR2	SR	
	ufc/g promedio	log ufc/g	ufc/g promedio	log ufc/g					
673	6,2E+03	3,79	6,3E+03	3,80	3,80	119,19	0,00		0,12
672	4,9E+03	3,69	2,8E+03	3,45	3,57	112,06	0,03		2SR
675	2,8E+03	3,45	3,3E+03	3,52	3,48	109,36	0,00		0,24
698	3,9E+03	3,59	6,9E+03	3,84	3,71	116,65	0,03		CV
887	2,0E+03	3,30	2,6E+03	3,41	3,36	105,44	0,01		3,28
					3,58	112,54	0,01		

Valor de referencia	ufc/g	log ufc/g
	1,5E+03	3,18

Tabla 12. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) obtenido en la Prueba 2 para el recuento de aerobios mesófilos por TEMPO.

Enterobacterias por microbiología clásica:

Se obtuvo un CV de 2,51% y una Exactitud de 111,82% (tabla 13), de manera que se cumplen los criterios de aceptación establecidos para la Precisión y la Exactitud.

PRUEBA 2

Matriz	Serie C		Serie D		Promedio	TBX		SR
	ufc/g promedio	log ufc/g	ufc/g promedio	log ufc/g		Recuperac.	SR2	
673	1,49E+03	3,17	2,11E+03	3,32	3,25	113,75	0,01	0,08
672	1,67E+03	3,22	2,09E+03	3,32	3,27	114,55	0,00	2SR
675	1,67E+03	3,22	1,52E+03	3,18	3,20	112,12	0,00	0,16
698	1,73E+03	3,24	1,73E+03	3,24	3,24	113,42	0,00	CV
887	1,24E+03	3,09	8,30E+02	2,92	3,01	105,27	0,01	2,51
					3,19	111,82	0,01	

Valor de referencia	ufc/g	log ufc/g
	7,2E+02	2,85

Tabla 13. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) obtenido en la Prueba 2 para el recuento de Enterobacterias por microbiología clásica.

Enterobacterias por TEMPO:

Tal y como se recoge en la tabla 14, se obtuvo un CV fue de 7,09% y una Exactitud de 110,53%. Se cumplen los criterios de aceptación establecidos para Precisión y Exactitud.

PRUEBA 2

Matriz	Serie C		Serie D		Promedio	TBX		SR
	ufc/g promedio	log ufc/g	ufc/g promedio	log ufc/g		Recuperac.	SR2	
673	1,7E+03	3,23	2,1E+03	3,32	3,28	114,76	0,00	0,22
672	9,9E+02	3,00	2,2E+03	3,34	3,17	111,00	0,06	2SR
675	7,1E+02	2,85	1,8E+03	3,26	3,05	106,95	0,08	0,45
698	1,8E+03	3,26	2,2E+03	3,34	3,30	115,55	0,00	CV
887	1,6E+03	3,20	5,7E+02	2,76	2,98	104,38	0,10	7,09
					3,16	110,53	0,05	

Valor de referencia	ufc/g	log ufc/g
	7,2E+02	2,85

Tabla 14. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) obtenido en la Prueba 2 para el recuento de Enterobacterias por TEMPO.

E. coli por microbiología clásica:

Se obtuvo un CV de 2,51% y una Exactitud de 112,89% (tabla 15), cumpliéndose los criterios de aceptación previamente establecidos para Precisión y Exactitud.

PRUEBA 2

Matriz	Serie C		Serie D		Promedio	TBX		SR
	ufc/g promedio	log ufc/g	ufc/g promedio	log ufc/g		Recuperac.	SR2	
673	1,46E+03	3,16	2,28E+03	3,36	3,26	114,23	0,02	SR
672	1,81E+03	3,26	2,07E+03	3,31	3,29	115,11	0,00	0,08
675	1,76E+03	3,25	1,52E+03	3,18	3,21	112,54	0,00	2SR
698	1,47E+03	3,17	1,76E+03	3,25	3,21	112,31	0,00	0,16
887	1,23E+03	3,09	1,61E+03	3,21	3,15	110,25	0,01	CV
					3,22	112,89	0,01	2,51

Valor de referencia	ufc/g	log ufc/g
	7,2E+02	2,85

Tabla 15. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) obtenido en la Prueba 2 para el recuento de *E. coli* por microbiología clásica.

E. coli por TEMPO:

Como se recoge en la tabla 16, se obtuvo un CV de 4,49% y una exactitud de 113,10%, cumpliéndose así los criterios de aceptación establecidos para la Precisión y la Exactitud.

PRUEBA 2

Matriz	Serie C		Serie D		Promedio	TBX		SR
	ufc/g promedio	log ufc/g	ufc/g promedio	log ufc/g		Recuperac.	SR2	
673	4,1E+03	3,61	3,0E+03	3,48	3,54	124,17	0,01	SR
672	1,6E+03	3,20	1,9E+03	3,28	3,24	113,54	0,00	0,14
675	1,1E+03	3,04	1,7E+03	3,23	3,14	109,84	0,02	2SR
698	1,2E+03	3,08	1,4E+03	3,15	3,11	109,03	0,00	0,29
887	8,3E+02	2,92	2,0E+03	3,30	3,11	108,94	0,07	CV
					3,23	113,10	0,02	4,49

Valor de referencia	ufc/g	log ufc/g
	7,2E+02	2,85

Tabla 16. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) obtenido en la Prueba 2 para el recuento de *E. coli* por TEMPO.

7.3.2 Condiciones de reproducibilidad

Aerobios mesófilos

Como se recoge en la tabla 17 se obtiene un valor medio de CV% de 3,39 y una recuperación de 104,29%. En cuanto a la Incertidumbre expandida se obtuvo un resultado de $\pm 0,23 \log_{10} \text{ ufc/g}$, con unos límites de $[10^y -59\%, 10^y +168\%]$.

Microbiología clásica										
Matriz	Prueba 1			Prueba 2			Promedio	Recuperac.	SR2	SR
	Serie A	Serie B	Promedio	Serie C	Serie D	Promedio				
	log ufc/g									
673	3,33	3,18	3,26	3,44	3,43	3,43	3,34	104,62	0,02	0,11
672	3,34	3,16	3,25	3,41	3,46	3,43	3,34	104,56	0,02	2SR
675	3,29	3,59	3,44	3,44	3,38	3,41	3,43	107,13	0,00	0,23
698	3,27	3,10	3,19	3,44	3,37	3,40	3,29	103,03	0,02	CV
887	3,23	3,17	3,20	3,33	3,32	3,33	3,26	102,10	0,01	3,39
Promedio total							3,33	104,29	0,01	

	ufc/g	log ufc/g
Valor ref. promedio	1,58E+03	3,20

Tabla 17. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) e incertidumbre expandida (2SR) para el recuento de aerobios mesófilos por microbiología clásica.

En el caso del análisis por TEMPO (Tabla 18) se obtuvo un valor medio de CV% de 5,94 y de recuperación media de 108,70%. La Incertidumbre expandida fue de $\pm 0,41 \log_{10} \text{ ufc/g}$, con límites $[10^y -39\%, 10^y +259\%]$.

TEMPO										
Matriz	Prueba 1			Prueba 2			Promedio	Recuperac.	SR2	SR
	Serie A	Serie B	Promedio	Serie C	Serie D	Promedio				
	log ufc/g									
673	3,38	3,30	3,34	3,79	3,80	3,80	3,57	111,60	0,10	0,21
672	3,41	3,38	3,40	3,69	3,45	3,57	3,48	108,94	0,01	2SR
675	3,41	3,75	3,58	3,45	3,52	3,48	3,53	110,48	0,00	0,41
698	3,20	3,45	3,33	3,59	3,84	3,71	3,52	110,10	0,08	CV
887	3,20	3,18	3,19	3,30	3,41	3,36	3,27	102,40	0,01	5,94
Promedio total							3,48	108,70	0,04	

	ufc/g	log ufc/g
Valor ref. promedio	1,58E+03	3,20

Tabla 18. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) e incertidumbre expandida (2SR) para el recuento de aerobios mesófilos por TEMPO.

Enterobacterias

Mediante análisis con microbiología clásica (Tabla 19) se obtiene un valor medio de CV% de 4,08 y una recuperación de 109,32%. En cuanto a la Incertidumbre expandida se obtuvo un resultado de $\pm 0,25 \log_{10} \text{ ufc/g}$, con unos límites de [$10^y -56\%$, $10^y +180\%$], cumpliéndose los criterios de aceptación y rechazo establecidos.

Microbiología clásica										
Matriz	Prueba 1			Prueba 2			Promedio	Recuperac.	SR2	SR
	Serie A	Serie B	Promedio	Serie C	Serie D	Promedio				
	log ufc/g									
673	2,95	2,97	2,96	3,17	3,32	3,25	3,10	108,95	0,04	0,13
672	3,12	3,15	3,13	3,22	3,32	3,27	3,20	112,40	0,01	2SR
675	2,85	3,11	2,98	3,22	3,18	3,20	3,09	108,47	0,02	0,25
698	3,19	3,14	3,16	3,24	3,24	3,24	3,20	112,39	0,00	CV
887	2,88	3,00	2,94	3,09	2,92	3,01	2,97	104,40	0,00	4,08
Promedio total							3,11	109,32	0,02	

	ufc/g	log ufc/g
Vref. TBX	7,05E+02	2,85

Tabla 19. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) e incertidumbre expandida (2SR) para el recuento de Enterobacterias por microbiología clásica.

Mediante análisis con TEMPO (Tabla 20) se obtuvo un valor medio de CV% de 4,58 y de recuperación media de 108,04%. La Incertidumbre expandida fue de $\pm 0,28 \log_{10} \text{ ufc/g}$, con límites [$10^y -52\%$, $10^y +191\%$], cumpliendo así los criterios de aceptación establecidos

TEMPO										
Matriz	Prueba 1			Prueba 2			Promedio	Recuperac.	SR2	SR
	Serie A	Serie B	Promedio	Serie C	Serie D	Promedio				
	log ufc/g									
673	2,93	2,92	2,93	3,23	3,32	3,28	3,10	108,90	0,06	0,14
672	3,11	3,26	3,18	3,00	3,34	3,17	3,18	111,54	0,00	2SR
675	2,64	3,08	2,86	2,85	3,26	3,05	2,96	103,83	0,02	0,28
698	3,28	2,95	3,11	3,26	3,34	3,30	3,21	112,58	0,02	CV
887	2,86	2,95	2,91	3,20	2,76	2,98	2,94	103,34	0,00	4,58
Promedio total							3,08	108,04	0,02	

	ufc/g	log ufc/g
Vref. TBX	7,05E+02	2,85

Tabla 20. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) e incertidumbre expandida (2SR) para el recuento de Enterobacterias por TEMPO.

E.coli

Mediante análisis con microbiología clásica (Tabla 21) se obtiene un valor medio de CV% de 2,77 y una recuperación de 111,19%. En cuanto a la Incertidumbre expandida se obtuvo un resultado de $\pm 0,25 \log_{10} \text{ ufc/g}$, con unos límites de [$10^Y -67\%$, $10^Y +150\%$]. Se cumplen los criterios de aceptación y rechazo estadísticos establecidos.

Microbiología clásica										
Matriz	Prueba 1			Prueba 2			Promedio	Recuperac.	SR2	SR
	Serie A	Serie B	Promedio	Serie C	Serie D	Promedio				
673	2,71	3,70	3,21	3,16	3,36	3,26	3,23	113,56	0,00	0,09
672	3,18	3,21	3,20	3,26	3,31	3,29	3,24	113,79	0,00	2SR
675	2,88	3,14	3,01	3,25	3,18	3,21	3,11	109,21	0,02	0,18
698	3,10	3,16	3,13	3,17	3,25	3,21	3,17	111,24	0,00	CV
887	2,98	3,04	3,01	3,09	3,21	3,15	3,08	108,15	0,01	2,77
Promedio total							3,17	111,19	0,01	

	ufc/g	log ufc/g
Vref. TBX	7,05E+02	2,85

Tabla 21. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) e incertidumbre expandida (2SR) para el recuento de Enterobacterias por microbiología clásica.

Mediante análisis con TEMPO (Tabla 22) se obtuvo un valor medio de CV% de 4,98 y de recuperación media de 110,84%. La Incertidumbre expandida fue de $\pm 0,31 \log_{10} \text{ ufc/g}$, con límites [$10^Y -48\%$, $10^Y +206\%$], cumpliéndose los criterios estadísticos establecidos.

TEMPO										
Matriz	Prueba 1			Prueba 2			Promedio	Recuperac.	SR2	SR
	Serie A	Serie B	Promedio	Serie C	Serie D	Promedio				
673	3,15	3,20	3,18	3,61	3,48	3,54	3,36	117,97	0,07	0,16
672	3,34	3,08	3,21	3,20	3,28	3,24	3,23	113,27	0,00	2SR
675	3,20	3,30	3,25	3,04	3,23	3,14	3,19	112,15	0,01	0,31
698	2,85	2,95	2,90	3,08	3,15	3,11	3,01	105,56	0,02	CV
887	2,85	2,92	2,89	2,92	3,30	3,11	3,00	105,25	0,03	4,98
Promedio total							3,16	110,84	0,02	

	ufc/g	log ufc/g
Vref. TBX	7,05E+02	2,85

Tabla 22. Cálculo del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación (CV) e incertidumbre expandida (2SR) para el recuento de Enterobacterias por TEMPO.

8. CONCLUSIONES

La validación de un método analítico permite evaluar las características del método y determinar si estas cumplen o no los requisitos previamente establecidos, concluyendo si el método analítico es válido o no para el uso que se le va a dar. Dentro del proceso de validación el cálculo y análisis de la incertidumbre es vital, ya que permite determinar la capacidad técnica del laboratorio de ensayo, permitiendo comparar mediciones entre sí o con otros valores de referencia dados en especificaciones o normas.

Al igual que los resultados, las conclusiones se dividen en conclusiones bajo condiciones de repetibilidad y bajo condiciones de reproducibilidad.

Repetibilidad

Como se infiere de los resultados obtenidos, en cada una de las pruebas realizadas para cada parámetro microbiológico se cumplen los criterios de aceptación establecidos para Precisión y Exactitud, tanto para el análisis mediante microbiología clásica como mediante el sistema automatizado TEMPO. No existen grandes diferencias para los parámetros estadísticos entre los dos métodos analíticos, no observando un patrón homogéneo en cuanto a la mayor o menor Precisión y Exactitud según el parámetro microbiológico analizado y/o analista (Prueba 1 o 2): los datos obtenidos mediante microbiología clásica se obtienen a partir de los recuentos realizados por el analista, lo que depende de la distribución de las unidades formadoras de colonia en la placa de cultivo, así como de la mayor o menor facilidad de las colonias para ser detectadas por medios visuales.

Reproducibilidad

En este caso también se cumplen los criterios de aceptación establecidos para Precisión y Exactitud, para cada método analítico y parámetro microbiológico. De nuevo no se aprecian grandes diferencias entre métodos analíticos aunque puede apreciarse una tendencia general a que el análisis mediante TEMPO sea menos preciso

pero más exacto; no obstante esto último no puede considerarse como una máxima, sino como una observación.

En condiciones de reproducibilidad tiene un papel vital el cálculo de la Incertidumbre, por las razones vistas a lo largo de la presente memoria y al inicio de este apartado. La Incertidumbre obtenida siempre es mayor en el análisis mediante TEMPO, independientemente del parámetro microbiológico, siendo mayor la diferencia en Aerobios mesófilos y *E. coli*. Que la Incertidumbre sea mayor para el sistema TEMPO concuerda con lo esperado para este parámetro: este método se basa en la detección de la turbidez por pocillo y dilución, a partir de la cual realiza un cálculo estadístico mediante el que obtiene las ufc/g, mientras que mediante microbiología clásica se realiza un recuento manual de las ufc que han crecido en un medio de cultivo determinado; el error estadístico de TEMPO es mayor que el de microbiología clásica, aunque menor que el del NMP. No obstante las diferencias de Incertidumbre entre ambos tampoco son excesivas, lo que, junto con el ahorro de tiempo y esfuerzo que supone el uso del sistema TEMPO, hace que no pueda ser considerado como un aspecto negativo.

A la vista de los resultados se concluye que ambos métodos analíticos son válidos para el análisis de los tres parámetros microbiológicos en el tipo de matrices utilizadas (carne fresca, productos cárnicos y platos preparados enlatados), ya que cumplen los criterios establecidos para los parámetros estadísticos estipulados tanto en repetibilidad como reproducibilidad. La elección de un método u otro, por tanto se basaría principalmente en criterios económicos y de tiempo, no en criterios de exactitud y precisión.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Gabinete de servicios para la calidad (GSC). Documentación del curso sobre validación y cálculo de incertidumbres en ensayos microbiológicos.
- [2] Entidad Nacional de Acreditación. *Guía para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos, G-ENAC-04*. ENAC 2002.
- [3] Larry Maturin and James T. Peeler (2001). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 3: Aerobic Plate Count. Disponible en web: www.fda.gov.
- [4] A. Puerta-García y F. Mateos-Rodríguez (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 2010, vol. 10, Nº 51, p 3426l.
- [5] Peter Feng, Stephen D. Weagant, Michael A. Grant and William Burkhardt (. Bacteriological Analytical Manual (2002). Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Disponible en web: www.fda.gov
- [6] Asociación Española de Normalización y Certificación. *Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal- Requisitos generales y guía para el examen microbiológico*. UNE-EN ISO 7218:2007. AENOR 2008.
- [7] bioMérieux. Manual de Usuario de TEMPO.
- [8] Robert Blodgett (2010). Bacteriological Analytical Manual. Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions. Vía www.fda.gov
- [9] Association Française de Normalisation. *Validation certificate for alternative analytical method according to standard EN ISO 16140:2003*. AFNOR/ISO 16140 BIO 12/21-12/06. AFNOR 2012
- [10] Herranz Sorribes, Carmen. Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria. En: *VI workshop MRAMA* (Universidad Autónoma de Barcelona, 20-23 de Abril 2007). *Alimentaria*, 2008, p. 109-113.

[11] Comisión de las Comunidades Europeas. *Reglamento (CE) Nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, y posterior modificación Reglamento (CE) Nº 1441/2007) de 5 de Diciembre de 2007*. Diario Oficial de la Unión Europea, 2006 y 2008.

[12] Asociación Española de Normalización y Certificación. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. AENOR 2005.

[13] International Standardization Organization. *Microbiology of food and animal feeding stuffs- Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*. ISO/TS 19036. ISO 2006

[14] Asociación Española de Normalización y Certificación. *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismo- Técnica de recuento de colonias a 30°C*. UNE-EN ISO 4833:2003. AENOR 2004.

[15] International Standardization Organization. *Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 2: Colony-count method*. ISO 21528-2:2004. ISO 2004

[16] International Standardization Organization. *Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli. Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronidase*. ISO 16649-2:2001. ISO 2001

ANEXO I

LÍMITES MICROBIOLÓGICOS POR PARÁMETRO Y TIPO DE ALIMENTO

Alimento	PARÁMETRO					Legislación
	Aerobios mesófilos (ufc/g)		E. coli (ufc/g)		Enterobacterias (ufc/g)	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Límite	
Carne separada mecánicamente	5x10 ⁵	5x10 ⁶	50	500	NA	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007
Carne picada destinada a ser consumida en crudo	5x10 ⁵	5x10 ⁶	50	500	NA	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007.
Carne picada de carne de aves de corral destinada a ser consumida cocinada	5x10 ⁵	5x10 ⁶	50	500	NA	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007.
Carne picada a base de especies distintas a las aves de corral destinada a ser consumida cocinada	5x10 ⁵	5x10 ⁶	50	500	NA	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007
Preparados a base de carne de ave destinados a ser consumidos cocinados (salchichas frescas, longaniza fresca, butifarra, hamburguesas, etc)	NA	NA	500	5x10 ³	NA	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007.

Preparados de carne destinados a ser consumidos en crudo	NA	NA	500	5x10 ³	NA	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007.
Preparados a base de carne de especies distintas a aves de corral destinados a ser consumidos cocinados (salchicha fresca, longaniza fresca, hamburguesa, butifarra, lomo)	NA	NA	500	5x10 ³	NA	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007.
Jamón cocido y fiambre de jamón	NA	NA	NA	NA	10 ²	Como referencia O. 29/6/83 BOE 5/7/83 R. 26/12/83 BOE 3/1/84
Paleta cocida y fiambre de paleta	NA	NA	NA	NA	10 ²	Como referencia O. 29/6/83 BOE 5/7/83 R. 26/12/83 BOE 3/1/84
Magro de cerdo cocido y fiambre de magro de cerdo	NA	NA	NA	NA	10 ²	Como referencia O. 29/6/83 BOE 5/7/83 R. 26/12/83 BOE 3/1/84
Comidas preparadas con tratamiento térmico (callos, fabada, cocido, etc)	10 ⁴	10 ⁵	10	10 ²	Ausencia	Como referencia RD 3484/2000 derogado por R.D.135/2010. BOE 12/1/2001

Fuente: *Recopilación de normas microbiológicas y parámetro físico-químicos relacionados.* Manuel Moragas Encuentra (Subárea de Sanidad Alimentaria y Consumo del Ayto. de Bilbao) y M^a Begoña de Pablo Busto (Subdirección de Salud Pública, Dirección Territorial de Bizakia, Dpto. de Sanidad. Gobierno Vasco)