

**UNIVERSIDAD GALILEO  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**

**Validación del método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *Escherichia coli* en leche humana, bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente**

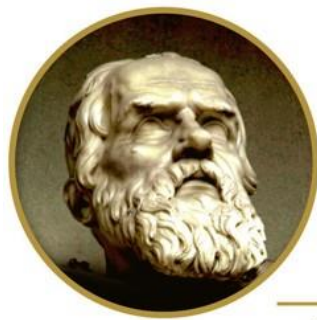


**ASTRID DAYANARA SAMAYOA ORDOÑEZ  
SERGIO DANILO HERNANDEZ DE LEÓN**

**GUATEMALA, OCTUBRE DEL 2,023**

**UNIVERSIDAD GALILEO**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**

**Validación del Método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *Escherichia coli* en leche humana, bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente**



**Galileo**  
UNIVERSIDAD

La Revolución en la Educación

TRABAJO DE TESIS PRESENTADO A LA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE:

**LICENCIATURA EN QUÍMICA-BIOLÓGICA**

EN EL GRADO ACADÉMICO DE:

**LICENCIADO**

AUTOR(ES):

**ASTRID DAYANARA SAMAYOA ORDOÑEZ 14008321**  
**SERGIO DANILO HERNANDEZ DE LEON 13003984**

**GUATEMALA, OCTUBRE DEL 2,023**

**MIEMBROS DEL CONSEJO DIRECTIVO  
DE UNIVERSIDAD GALILEO**

**Dr. José Eduardo Suger Cofiño. Ph.D.**  
Rector

**Dra. Mayra Roldán de Ramírez**  
Vicerrectora

**Lic. Jean Paul Suger**  
Vicerrector Administrativo

**Lic. Jorge Francisco Retolaza, M. Sc.**  
Secretario General

**MIEMBOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
FACISA GUATEMALA**

**Dra. Vilma Judith Chávez de Pop**

Decana  
Facultad Ciencias de la Salud

**Licda. Glenda Escalante**

Coordinadora Académico  
Química Biológica

**Dr. Rodolfo Froilan Juárez Tobias, Ph.D.**

Director Sede Quetzaltenango

**JURADO NOMBRADO PARA LA DEFENSA DE TESIS DENOMINADA:**

**Validación del método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *Escherichia coli* en leche humana, bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente**

Licda. Claudia Galindo  
**Química Bióloga**

Licda. Silvia España  
**Nutricionista**

Doctor. Rodolfo Juárez  
**Decano de la Facultad Ciencias de la Salud, sede Quetzaltenango**

**Validación del método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *Escherichia coli* en leche humana, bajo las condiciones del Laboratorio de del Hospital Regional de Occidente**

Solamente el autor es responsable del contenido y validez del presente informe de investigación



Quetzaltenango, 20 de octubre de 2023

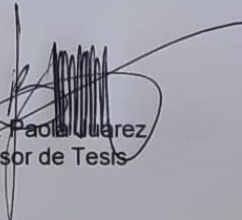
Doctora:  
Vilma Chávez de Pop  
Decana  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Universidad Galileo

Respetable Dra. Chávez:

Tengo el gusto de informarle que he realizado la revisión de trabajo de tesis titulado: **“VALIDACIÓN DEL MÉTODO OFICIAL AOAC 986.33 PARA EL RECuento DE ESCHERICHIA COLI EN LECHE HUMANA, BAJO LAS CONDICIONES DEL LABORATORIO DEL HOSPITAL REGIONAL DE OCCIDENTE”** de los alumnos: **ASTRID DAYANARA SAMAYOA ORDOÑEZ y SERGIO DANILO HERNÁNDEZ DE LEÓN.**

Después de realizar la revisión del trabajo he considerado que cumple con todos los requisitos técnicos solicitados, por lo tanto, los autores y el asesor se hacen responsables del contenido y conclusiones de la misma.

Atentamente,



Licda. Paola Juárez  
Asesor de Tesis



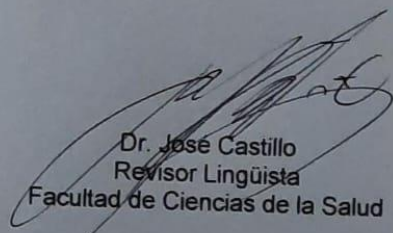
Quetzaltenango, 21 de octubre de 2023

Doctora:  
Vilma Chávez de Pop  
Decana  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Universidad Galileo

Respetable Dra. Chávez:

De manera atenta me dirijo a usted para manifestarle que los alumnos: **ASTRID DAYANARA SAMAYOA ORDOÑEZ y SERGIO DANILO HERNÁNDEZ DE LEÓN** de la Licenciatura en Química Biológica, culminaron su informe final de tesis titulado: **"VALIDACIÓN DEL MÉTODO OFICIAL AOAC 986.33 PARA EL RECUESTO DE ESCHERICHIA COLI EN LECHE HUMANA, BAJO LAS CONDICIONES DEL LABORATORIO DEL HOSPITAL REGIONAL DE OCCIDENTE"**. Ha sido objeto de revisión gramatical y estilística, por lo que pueden continuar con el trámite de graduación.

Atentamente,



Dr. José Castillo  
Revisor Lingüista  
Facultad de Ciencias de la Salud





Quetzaltenango 05 de noviembre de 2023

Señores:

**ASTRID DAYANARA SAMAYOA ORDOÑEZ**  
**SERGIO DANILO HERNÁNDEZ DE LEÓN**

Presente.

Estimados alumnos:

Tengo el gusto de informarles que después de haber revisado su trabajo de investigación de Tesis para la **Licenciatura en Química Biológica**, cuyo título es: **"VALIDACIÓN DEL MÉTODO OFICIAL AOAC 986.33 PARA EL RECuento DE ESCHERICHIA COLI EN LECHE HUMANA, BAJO LAS CONDICIONES DEL LABORATORIO DEL HOSPITAL REGIONAL DE OCCIDENTE"** y de haber obtenido el dictamen de su asesor específico, les autorizo la publicación del mismo.

Aprovecho la oportunidad para felicitarlas por el magnífico trabajo realizado, el cual es de indiscutible beneficio para las Ciencias de la Salud.

Atentamente,

Dra. Vilma Chávez de Pop  
Decana  
Facultad de Ciencias de la Salud

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestro padre Dios, que ha sido nuestro guiador en este camino, quien nos dio la vida, la sabiduría y la oportunidad para terminar esta etapa de nuestras vidas, sin él no estaríamos en donde estamos y por darnos la dicha de tener unos padres maravillosos.

A nuestros padres que son las personas que más nos apoyaron en nuestro camino y por ser los mejores ejemplos de amor, esfuerzo y trabajo, por toda la paciencia que tuvieron con nosotros.

A la Universidad Galileo por ser nuestra casa formadora, por permitirnos tener como docentes a grandes profesionales quienes a ellos les debemos nuestros conocimientos adquiridos.

A nuestra asesora, la Licda. Paola Juárez y a nuestro revisor el Dr. José Alfonso Castillo, por el tiempo y el apoyo dedicado a nuestro estudio, gracias por permitirnos terminar este proceso y por las enseñanzas que nos compartieron en el camino.

Al Laboratorio del Hospital Regional de Occidente por permitirnos realizar nuestra investigación dentro de sus instalaciones.

## Índice

UNIVERSIDAD GALILEO.....	i
UNIVERSIDAD GALILEO.....	ii
MIEMBROS DEL CONSEJO DIRECTIVO.....	iii
JURADO NOMBRADO PARA LA DEFENSA DE TESIS DENOMINADA: .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	x
Introducción.....	1
Planteamiento del problema.....	5
Justificación .....	7
Objetivos.....	10
General.....	10
Específicos .....	10
Hipótesis .....	11
Variables.....	12
Método oficial AOAC 986.33.....	12
Definición Conceptual del método oficial AOAC 986.33.....	12
Definición Operacional del método oficial AOAC 986.33. ....	12
<i>E. coli</i> .....	12
Definición Conceptual de <i>E. coli</i> .....	12
Definición Operacional de <i>E. coli</i> .....	12

Leche humana .....	13
Definición Conceptual de Leche Humana. ....	13
Definición Operacional de Leche Humana.....	13
Marco Teórico.....	14
<i>Escherichia coli (E. coli)</i> .....	14
Generalidades.....	14
Morfología .....	15
Cepas ATCC .....	15
Cepa E. coli ATCC25922 .....	16
Banco de Leche.....	16
Leche humana .....	17
Generalidades de la Leche Humana.....	17
Lactancia materna en la primera hora de vida .....	18
Principales agentes microbianos presentes en la leche humana .....	19
Placas Petrifilm 3M.....	20
Placas Petrifilm 3M (EC).....	21
Características de E. coli en Placas Petrifilm 3M .....	22
Utilización de Placas Petrifilm 3M.....	23
Ventajas de las Placas Petrifilm 3M .....	23
Desventajas de las Placas Petrifilm 3M .....	24

Validación de métodos.....	25
Definición .....	25
¿Cuándo debe validarse un método?.....	25
Etapas en el proceso de validación .....	26
Tipos de métodos de validación.....	26
Técnicas para la validación.....	28
Tipos de métodos microbiológicos .....	29
Variabilidad con métodos microbiológicos .....	30
Recuperación del método.....	30
Protocolo e Informe de validación.....	31
Protocolo de validación.....	31
Informe de validación .....	32
Parámetros de desempeño del método.....	32
Repetibilidad.....	32
Reproducibilidad.....	33
Porcentaje de recuperación .....	33
Incertidumbre.....	34
Técnica oficial de la AOAC 986.33: Recuento de EC en la leche (Métodos de película seca rehidratable) .....	37
Principio.....	37

Aparatos .....	37
Análisis .....	38
Metodología de la Investigación.....	40
Universo.....	40
Participantes.....	40
Criterios de inclusión .....	40
Criterios de exclusión .....	41
Diseño estadístico .....	41
Instrumento .....	41
Material y Equipo: .....	41
Metodología de análisis .....	43
Metodología para la recepción muestra de leche materna pasteurizada .....	43
Metodología para la esterilización del equipo y área.....	43
Metodología para la preparación del inóculo.....	44
Metodología para la preparación de muestras inoculadas artificialmente con <i>E. coli</i> ..	44
Metodología para la inoculación en Placas Petrifilm 3M para recuento de <i>E. coli</i> .....	45
Interpretación de resultados .....	45
Placas Petrifilm EC .....	45
Análisis estadístico.....	46

Reproducibilidad, repetibilidad intra-laboratorio e incertidumbre expandida .....	46
Porcentaje de recuperación .....	47
Tabulación de los datos.....	47
Análisis estadístico.....	48
Resultados .....	49
Discusión de Resultados .....	54
Conclusiones .....	57
Recomendaciones .....	59
Referencias bibliográficas.....	60
Anexo 1	
Guía de interpretación de Placas Petrifilm para el Recuento de EC.....	64

## Introducción

El método utilizado para la determinación de *Escherichia coli* (*E. coli*) en alimentos se basa en la fermentación de la lactosa, por medio del método del número más probable (NMP), que es un método estadístico, compuesto por una etapa presuntiva y confirmativa. El método de NMP consiste en sembrar diluciones seriadas de la muestra en medios líquidos y basándose en la combinación de tubos positivos se puede estimar el número de microorganismos presentes por gramo de alimento. (Feng et al., 2022)

La AOAC International es una asociación científica dedicada a la publicación de métodos estandarizados de análisis químicos, con sede en Maryland, Estados Unidos, incluye un método de validación del *E. coli*, descrito en la Revisión 3 de la 18ª Edición de los Métodos Oficiales de Análisis de la AOAC Internacional (Horwitz y Latimer, 2010, p. 67). aplicados a la leche (986.33) conocido como Placas Petrifilm para recuento de *E.coli/coliformes* (EC), que es una marca registrada de la compañía 3M. La placa de recuento proporciona información de *E. Coli* con resultados confirmados en sólo 24 a 48 horas, en análisis de alimentos.

En el entorno actual existe un mayor enfoque en la seguridad de los alimentos y los requisitos de calidad cada vez más estrictos, los laboratorios están bajo presión para proporcionar pruebas rápidas, confiables y precisas. Entre estas se incluyen las Placas Petrifilm 3M que puede ser utilizado como un método alternativo, ya que eliminan los pasos posteriores de confirmación requeridos con la mayoría de los métodos de referencia tradicionales, ayudan a aumentar la productividad y reducir los costos generales del laboratorio. (3M petrifilm, Placas de recuento EC, 2023)



Este método es una “versión modificada del método de recuento de placas de unidades formadoras de colonias (UFC), que consiste en dos películas estériles rehidratables en seco impregnadas con medio de cultivo y agentes gelificantes solubles en agua fría. La inoculación se lleva a cabo en la superficie del revestimiento (película inferior), que, después de la inoculación se cubre con la película superior. El inóculo se extiende uniformemente utilizando un esparcidor de plástico y aplicando una suave presión manual. Después de la solidificación del gel, las placas se incuban para el desarrollo de colonias. El medio utilizado en las placas es el Agar de Recuento de Placas Estándar (PCA) pero complementado con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium, un indicador que cuando se reduce, da colonias *E. coli* de un color azul”. (AOAC international, 2023, pág. 527)

Para poder comprender de mejor manera el siguiente estudio es importante definir que es validación, según la norma ISO 9000 define a la validación como “la confirmación, mediante la provisión de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos especificados”. (ISO, 2023)

Por su parte la Guía de Eurachem establece que un método debe validarse cuando sea necesario para demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para su uso con un propósito particular, en este caso se busca su posible aplicación para el recuento de *E. coli*. (Magmusson & Ornemark, 2014, pág. 7)

El objetivo del presente estudio es validar el método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *E. coli* en leche humana, bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente.

Las muestras de leche utilizadas fueron proporcionadas a través del programa de recolección del Banco de Leche del Hospital Regional de Occidente, las cuales fueron inoculadas con tres niveles de inóculos establecidos de una cepa certificada de *E. coli* ATCC 25922 en 3 muestras de leche humana y una cuarta muestra de leche sin inocular como control negativo, posteriormente se sembraron un total de 30 muestras por cada nivel durante 3 días para su posible recuperación del patógeno *E. coli* ATCC 25922 a través del uso de Placas Petrifilm 3M.

El proceso técnico de la validación para el presente estudio consiste en: a) la reproducción de la cepa control, b) concentración del patógeno inicial, c) desarrollo y cuantificación de la muestra control, d) inoculación del patógeno en muestras de estudio y e) recuperación del patógeno control a través de Placas Petrifilm 3M.

Los parámetros de validación establecidos para el siguiente estudio son: reproducibilidad, repetibilidad, incertidumbre expandida y porcentaje de recuperación, a partir de los resultados obtenidos se establece que los valores obtenidos demuestran que los parámetros de desempeño cumplen con los criterios establecidos para el recuento de *E. coli* en muestras de leche humana.

Como resultado de la validación del método oficial AOAC 986.33 y su posible aplicación para el recuento de *E. coli* en el Laboratorio del Hospital Regional de Occidente o cualquier otro laboratorio puede generar los siguientes beneficios: a) contar con un método capaz de dar resultados en un tiempo de 48 horas, b) optimizar recursos con una técnica fácil, de menor costo y que requiera menos personal y c) contar con un método que se base en un método oficial.

Por lo que a partir de estudio se concluye que el método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *E. coli* en muestras de productos lácteos es completamente aplicable para el recuento de *E. coli* en muestras de leche humana bajo condiciones del laboratorio del Hospital Regional de Occidente.

## Planteamiento del problema

En Guatemala, los Bancos de Leche desempeñan un papel crucial en la atención médica neonatal al proporcionar leche humana a recién nacidos que se encuentran internados. La calidad microbiológica de esta leche es de suma importancia, ya que su inocuidad puede comprometer la salud de los recién nacidos, según datos presentados por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) en el año 2021 a través del programa de Bancos de Guatemala se recolectaron 5 mil 668 litros de leche los cuales beneficiaron a 11 mil 104 recién nacidos en riesgo (AGN, 2022)

Actualmente, se utiliza el método del número más probable (NMP) para la detección de *E. coli* en leche humana en los Bancos de Leche del país. Sin embargo, este método puede ser lento y costoso, lo que plantea la necesidad de explorar alternativas más eficientes, rápidos, fáciles y de bajo costo, para demostrar que cumple los requisitos microbiológicos establecidos por el MSPAS.

Según la OMS *E. coli* pertenece al grupo más ampliamente utilizado en la microbiología de alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas por lo que es de suma importancia garantizar la inocuidad de la leche humana que es pasteurizada y posteriormente dada a neonatos que se encuentren internados en el Hospital Regional de Occidente.

Al revisar la bibliografía no se ha encontrado documentación sobre la validación de un método para el recuento de *E. coli* en leche humana, tampoco utilizando Placas Petrifilm 3M, por lo que el desarrollo de esta investigación sería un aporte al campo microbiológico. Claramente es importante realizar una medición correcta y poder demostrar

que el resultado es correcto a través de los parámetros estadísticos de validación, por lo tanto, poder determinar si el método puede ser utilizado o no en leche humana. Una vez identificada la falta de información sobre otros métodos oficiales para la determinación de *E. coli* en leche humana tanto a nivel internacional y nacional que permitan obtener resultados rápidos y confiables y con una breve evaluación de lo que se realiza a nivel de Banco de Leche y Laboratorio del Hospital Regional de Occidente que permita la identificación rápida y confiable de la presencia de *E. coli* en muestras de leche humana.

La validación del método AOAC 986.33 para la determinación de *E. coli* en leche humana en Guatemala tiene el potencial de mejorar la eficiencia, reducir costos y garantizar la calidad microbiológica de la leche humana ofrecida a los neonatos. Este proyecto de investigación es esencial para abordar los desafíos específicos relacionados con la salud neonatal y la gestión de los Bancos de Leche en el país.

En base a lo anterior surge la siguiente pregunta:

¿Cuáles son las bases y los puntos críticos a considerar al evaluar la posibilidad de validar el método oficial AOAC 986.33 para la determinación de *E. coli* y su aplicación en leche humana bajo condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente, y cómo se puede establecer un control de calidad efectivo para garantizar resultados precisos y confiables a nivel intra-laboratorio?

## Justificación

La determinación rápida y precisa de *E. coli* en muestras de leche humana es esencial para garantizar la seguridad y calidad de la leche destinada al consumo de lactantes. El método oficial de la AOAC 986.33 es un estándar reconocido para la detección y el recuento de *E. coli* en productos lácteos.

Este estudio tiene como objetivo demostrar la validez e idoneidad de utilizar el método AOAC 986.33 para la determinación de *E. coli* en muestras de leche humana a través de un proceso de validación respaldado por evidencia científica.

En la actualidad, los avances científicos han proporcionado nuevos métodos para la detección y enumeración de microorganismos. Ejemplo de estos métodos son las Placas Petrifilm 3M, que ofrece una mayor facilidad de uso, resultados reproducibles y tiempos de respuesta más rápidos. Esto se debe a la eliminación del consumo de tiempo asociado con los métodos tradicionales de agar, que suelen aumentar los costos y reducir la productividad laboral.

Las placas de recuento Petrifilm (EC) 3M son un sistema listo para usar que contiene los elementos nutritivos del agar para recuento (PCA), un agente gelificante soluble en agua y un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de las colonias. Estas placas proporcionan resultados confirmados en un plazo de 24 a 48 horas y cada lote de Placas Petrifilm 3M pasa por rigurosas pruebas de calidad, certificadas bajo la Norma ISO 9001 (3M). Además, este método es reconocido por la AOAC para el recuento de *E. coli* leche (AOAC international, 2023).

La validación de un método según los criterios empleados por la AOAC implica una serie de beneficios significativos. Estos incluyen la obtención de evidencia científica que respalda la exactitud y confiabilidad de los resultados, reconocimiento internacional, reducción del riesgo de errores, aumento de la productividad y la demostración de que se opera con un sistema de trabajo seguro.

La validación del método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *E. coli* en leche humana no solo contribuirá a la calidad y seguridad de la leche, sino que también generará beneficios económicos para los laboratorios que lo implementen. Al ser un método más práctico y rápido, permitirá una mayor optimización del tiempo y los recursos económicos.

Este estudio busca establecer las bases y los puntos críticos a considerar al validar el método oficial AOAC 986.33 para la determinación de *E. coli* y su aplicación en leche humana bajo condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente, y cómo a partir de este estudio se puede establecer un control de calidad efectivo para garantizar resultados precisos y confiables a nivel intra-laboratorio.

Es relevante destacar que el método actualmente utilizado (NMP) para la determinación de EC requiere pruebas de tubos Durham que toman de 24 a 48 horas. Además, las pruebas positivas deben someterse obligatoriamente a una prueba confirmatoria utilizando un medio Caldo Bilis Brillante con un tiempo de incubación de 48 horas, según la norma técnica REDBLH-BR para bancos de leche humana. Esto significa que la determinación de la presencia de EC totales en muestras de leche humana lleva de 72 a 98 horas, (Feng et al., 2022). En contraste, el método AOAC 986.33 permite la determinación de *E. coli* en un máximo de 48 horas, según

datos de la guía de interpretación de resultados para el método oficial AOAC 986.33.

Las Placas Petrifilm (EC) se presentan como una alternativa más rápida y precisa para la detección de *E. coli* en leche humana en Guatemala. Su implementación podría mejorar significativamente la eficiencia en los bancos de leche, además de garantizar la calidad de la leche destinada a lactantes que dependen de este recurso.



## **Objetivos**

### **General**

Validar el método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *E. coli* bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente.

### **Específicos**

Emitir sugerencias para establecer los criterios de control de calidad interno, según los resultados de su desempeño.

Establecer las bases para poder efectuar la validación del método oficial AOAC 986.33 a nivel intra-laboratorio.

Emitir sugerencias para que otros laboratorios implementen esta metodología, considerando la evaluación de los beneficios y dificultades encontradas.

### **Hipótesis**

**H<sub>1</sub>:** El método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *E. coli*, puede ser empleado en leche humana bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente.

**H<sub>0</sub>:** El método oficial AOAC 986.33 para el recuento *E. coli*, no puede ser empleado en leche humana, bajo condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente.

## Variables

### **Método oficial AOAC 986.33**

#### ***Definición Conceptual del método oficial AOAC 986.33.***

Método para recuento de bacterias y coliformes en productos lácteos. Utiliza placas de cultivo bacteriano de medio seco y frío (AOAC international, 2023)

#### ***Definición Operacional del método oficial AOAC 986.33.***

Técnica cuantitativa realizada por medio de Placas Petrifilm 3M

### ***E. coli***

#### ***Definición Conceptual de E. coli.***

“*Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de homeotermos. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas. Sin embargo, algunas de ellas, como *E. coli* productora de toxina Shiga, pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos. La bacteria se transmite al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche cruda, y hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas” (OMS, 2018).

#### ***Definición Operacional de E. coli.***

Son bacterias que se utilizan como un indicador de contaminación fecal que pueden ser detectados por el método de recuento de *E. Coli* por medio de Placas Petrifilm 3M.

## **Leche humana**

### ***Definición Conceptual de Leche Humana.***

“Producto vivo de gran complejidad biológica, activamente protectora e inmunomoduladora que estimula el desarrollo adecuado del lactante” (Torre, 2010).

### ***Definición Operacional de Leche Humana.***

Es una muestra en estado líquido, obtenida de madres donadoras; la cual es objeto de análisis de estudio para el recuento de coliformes totales y *E. Coli*.

## Marco Teórico

### *Escherichia coli (E. coli)*

#### *Generalidades*

*Escherichia coli* originalmente conocida como *Bacterium coli commune*, fue identificada en 1885 por el pediatra alemán Theodor Escherich. *E. coli* está ampliamente distribuida en el intestino de humanos y animales de sangre caliente y es el anaerobio facultativo predominante en el intestino y parte de la flora intestinal esencial que mantiene la fisiología del huésped sano. *E. coli* es miembro de la familia Enterobacteriaceae, que incluye muchos géneros, incluidos patógenos conocidos como *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* no se consideran patógenos, pueden ser patógenos oportunistas que causan infecciones en huéspedes inmunocomprometidos. También existen cepas patógenas de *E. coli* que, cuando se ingieren, causan enfermedades gastrointestinales en humanos. (Feng et al., 2020)

Alrededor de 1915, el Servicio de Salud Pública de EE. UU. comenzó a utilizar coliformes en lugar de *E. coli* como estándar para el agua, basándose en la falsa suposición de que todos los coliformes poseen el mismo valor como indicadores sanitarios. La práctica original de realizar pruebas de *E. coli* y coliformes para evaluar la contaminación del agua se amplió primero para incorporar leche pasteurizada y productos lácteos, y luego a otros alimentos. (Salfinger & Tortorello, 2015, pág. 103)

Ya en 1927, los microbiólogos lácteos utilizaron *E. coli* como verdadero organismo indicador para evaluar la contaminación de la leche posterior a la pasteurización,

especialmente la contaminación procedente de botellas mal limpiadas. Se sabe que el proceso de pasteurización de la leche destruye la *E. coli*; por lo tanto, la presencia de cualquier *E. coli* en la leche, después de la pasteurización, puede indicar una pasteurización inadecuada, malas condiciones higiénicas en la planta de procesamiento (Salfinger & Tortorello, 2015, pág. 104)

### ***Morfología***

Las bacterias del género *E. coli* son Gram negativas, tienen forma de barra y pertenecen a la familia Enterobacteria, esta bacteria es un habitante común de los intestinos de todos los animales, incluyendo el intestino grueso de los humanos. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (Gram negativo), es anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), con dimensiones de 0.5 x 1.9 a 3.0 micras, no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, así como, positiva al indol, descarboxilación de lisina, fermentación de manitol y gas a partir de la glucosa, citrato negativa. (Garcia Lopez, 2013, pág. 18)

### ***Cepas ATCC***

Las Cepas ATCC (American Type Culture Collection) son herramientas indispensables para el control de calidad en los laboratorios microbiológicos, son microorganismos certificados utilizados en diferentes disciplinas, para el control de calidad en microbiología. Como conclusión, las Cepas ATCC, se usan en los laboratorios microbiológicos para: garantizar la calidad de los resultados de ensayo, evaluar la calidad de los medios de cultivo, validar los métodos microbiológicos utilizados. (TCM , 9).

### ***Cepa E. coli ATCC25922***

La cepa Seattle 1946 de *E. coli* es una cepa de control de calidad secuenciada del genoma completo que no produce verotoxina. Este organismo es una cepa de control CLSI para pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Se utiliza para pruebas de medios, como control negativo para la producción de toxina LT y como cepa de control de calidad para productos Abbott, API, Autobac, BBL, bioMerieux VITEK, Biosynth, Difco, IDS, Micro-Media, MicroScan, Roche Diagnostics y Sensititre. Se utiliza en pruebas de disco de susceptibilidad de neomicina, colistina [colimicina], kanamicina, cefalexina, gentamicinas, cefamandol, cefalotina, tetraciclina, cefaloglicina, cefaloridina [cefalomicina], ácido nalidíxico y cloranfenicol, así como una amplia aplicación en pruebas de alimentos, pruebas de medios y control de calidad. (ATCC 2023)

### **Banco de Leche**

Es un servicio especializado orientado a la promoción y el apoyo a la lactancia materna y responsable de proporcionar leche humana donada (LHD) a los pacientes que la precisen, garantizando su seguridad y calidad. Para ello, se encarga de la selección de las donantes, así como del almacenamiento, el procesamiento, el análisis y la distribución de la leche. (Montero et al, 2020)

En ausencia de la madre cuando el recién nacido es separado dentro del hospital por alguna complicación que no permite la estancia de la madre para su alimentación, la función principal del Banco de Leche es proveer leche humana a neonatos en buena cantidad y calidad, como una nueva alternativa que permite la atención nutricional de los

lactantes ingresados en las unidades neonatales que están imposibilitados de ser amamantados directamente. (MSPAS & PROSAN, 2012, pág. 9)

Toda leche recolectada en el Banco de Leche debe ser sometida al proceso de pasteurización y a un estricto control microbiológico ya que debe garantizar la calidad de la leche humana para evitar riesgos en la salud del neonato. Todos los procesos en el manejo de la muestra, como la recolección, transporte, recepción, preparación de los diferentes medios de cultivo, siembra de la muestra, identificación bacteriana y entrega del resultado, deben realizarse tomando en cuenta diferentes protocolos que garanticen un resultado confiable. (Flores, 2018, pág. 1)

## **Leche humana**

### ***Generalidades de la Leche Humana***

Según Salazar et al (2009) “La leche humana constituye el alimento natural e ideal para niños recién nacidos y lactantes. Sus características nutricionales brindan un crecimiento armónico, si se administra como único nutriente, a libre demanda, durante los primeros 6 meses de vida y, luego de esta edad, complementada con alimentos adecuados, oportunos y seguros.” (Salazar et al., 2009)

La leche humana es considerada el estándar de oro para la alimentación de los recién nacidos, y es la forma ideal de aportar a los niños pequeños nutrientes necesarios para un crecimiento y desarrollo saludables, beneficios nutricionales e inmunológicos que ayudan a proteger al lactante de enfermedades frecuentes como la diarrea y la neumonía,



dos causas principales de mortalidad infantil en todo el mundo. La leche humana es fácil de conseguir, lo cual ayuda a garantizar que el lactante tenga suficiente alimento. Por esto se hace necesario la promoción, protección y apoyo a esta práctica tan importante para la salud de los infantes, constituyendo una estrategia de salud pública para combatir la desnutrición y mortalidad infantil especialmente en menores de un año. (MSPAS & PROSAN, 2012, pág. 9)

Se ha demostrado en diversos estudios los beneficios obtenidos de la leche humana, los recién nacidos complicados presentan mejor progreso en la alimentación y en el estado nutricional teniendo menor riesgo de infecciones, enterocolitis necrotizante, desórdenes metabólicos, entre otros. (MSPAS & PROSAN, 2012, pág. 9)

### ***Lactancia materna en la primera hora de vida***

Los niños deben ser amamantados en forma exclusiva y a libre demanda desde el nacimiento y hasta los primeros seis meses de vida. Después continuar con lactancia materna y alimentos complementarios adecuados hasta los 2 años de vida, según recomienda la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para Infancia (UNICEF), a través de la Estrategia mundial “Iniciativa Hospital Amigo del Niño(a) y la Madre. (Salazar et al., 2009)

La leche humana, por sus múltiples beneficios sobre la salud incluso a largo plazo, es reconocida como el alimento de elección para todos los lactantes. Existen muy pocas contraindicaciones para que una madre no pueda alimentar a su hijo con su propia leche. Más frecuentemente, sobre todo en los casos de partos prematuros, no se dispone de leche

de madre propia inmediatamente después del nacimiento o de suficiente volumen como para que éste sea el alimento exclusivo durante un ingreso prolongado. En las situaciones en que no se dispone de leche de madre propia, la leche de madre donada es una alternativa válida, como reconoce la Academia Americana de Pediatría. La Organización Mundial de la Salud y la UNICEF, en su estrategia global para la alimentación del lactante y el niño, apoyan conjuntamente la existencia de bancos de leche humana (BLH) para promocionar y apoyar la lactancia materna (Gormaz et al , 2011, pág. 1)

### ***Principales agentes microbianos presentes en la leche humana***

La leche humana extraída cruda puede contener bacterias no patógenas entre las cuales se destacan diversas especies de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* o *Leuconostoc* ,en consecuencia estas bacterias constituyen la microbiota natural de la glándula mamaria y por ende, de la leche humana por otro lado están otras bacterias potencialmente patógenas procedentes de la piel, las manos o la nariz y boca de la madre como *K. Pneumoniae* o *S. Aureus* y otras indicativas de contaminación fecal como *E. Coli*. (Flores, 2018, pág. 13)

La presencia de estos últimos en la leche humana es indicativa de pobre higiene personal de la donante, malas prácticas durante la extracción o fallo en la cadena de frío durante el almacenaje en casa o el transporte hasta el banco. La contaminación excesiva por bacterias que usualmente se encuentran en la leche humana puede ocasionar otros

problemas al neonato, además de ser fuente de infección. Estos organismos son productores de enzimas que pueden actuar sobre los elementos nutricionales de la leche para formar compuestos, que resultan dañinos al niño. *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* son productores de lipasa que puede poner en libertad ácidos grasos, acentuando el problema de la ictericia en el neonato. Los bacilos Gram negativos producen proteasa que daña las inmunoglobulinas haciéndolas perder su función protectora y *E. coli* produce decarboxilasa que puede convertir los aminoácidos en aminas como la tiramina y triptamina que pueden ser tóxicas para el neonato (Flores, 2018, pág. 13)

La calidad microbiológica de la leche y los productos lácteos está influenciada por la flora inicial de la leche cruda, las condiciones de procesamiento y la contaminación posterior a la pasteurización. (Salfinger & Tortorello, 2015, pág. 645) Es la evaluación de la presencia o ausencia de microorganismos contaminantes es crucial para garantizar la calidad de un producto. (MSPAS & PROSAN, 2012, pág. 78)

### ***Placas Petrifilm 3M***

Las Placa Petrifilm 3M contienen un agente gelificante soluble en agua, nutrientes e indicadores, es decir, todos los componentes necesarios para el crecimiento microbiano. Por eso no se requiere preparación del medio de cultivo. (3M petrfilm, Placas de recuento EC, 2023, pág. 4)

Se crean e inspeccionan las placas Petrifilm 3M por un equipo de científicos e ingenieros de 3M, y están validados por organizaciones internacionales como: AOAC® PTM Performance Tested Method<sup>SM</sup>, AOAC® OMA Official Method of Analysis<sup>SM</sup> y NF

VALIDATION by AFNOR Certification. (3M petrfilm, Placas de recuento EC, 2023, pág. 6)

Todos los métodos Petrifilm emplean un medio de película deshidratada que se aplica a una tarjeta. Las Placas Petrifilm 3M utilizadas para la detección de *EC* utilizan una película que contiene agentes selectivos y/o diferenciales con un agente gelificante soluble en agua fría. El medio de recubrimiento se hidrata cuando se agrega 1 ml de una muestra diluida o sin diluir a una Placa Petrifilm de 20 cm<sup>2</sup>. La película protectora de plástico se baja con cuidado sobre la placa inoculada para evitar que queden atrapadas pequeñas burbujas de gas. La presión aplicada a un esparcidor de plástico colocado sobre la película superpuesta distribuye las porciones de prueba en 20 cm<sup>2</sup> (para las placas de recuento de EC). Las Placas Petrifilm 3M que contienen la muestra se dejan reposar a temperatura ambiente durante varios minutos para permitir la gelificación. Luego las Placas Petrifilm 3M se apilan en posición vertical (en pilas de 20 o menos) y se colocan en una incubadora. La incorporación de colorante de trifeniltetrazolio en Petrifilm facilita el recuento de colonias. También se puede utilizar un iluminador magnificado (por ejemplo, el contador de colonias de Quebec) al contar las Placas Petrifilm 3M. La absorción del colorante trifeniltetrazolio produce colonias rojas. (Salfinger & Tortorello, 2015, pág. 110)

### ***Placas Petrifilm 3M (EC).***

Las placas Recuento EC Petrifilm 3M proporcionan un método rentable, conveniente y confiable para evaluar materias primas, productos alimenticios, muestras ambientales. La placa Recuento EC proporciona información tanto de *E. coli* como del recuento de coliformes totales con resultados confirmados en solo 24 a 48 horas.

Las Placas Petrifilm 3M EC contienen nutrientes de Bilis Rojo-Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucoronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias. (3M petrfilm, Placas de recuento EC, 2023)

### ***Características de E. coli en Placas Petrifilm 3M***

La mayoría de las *E. coli* (cerca del 97%) produce beta-glucuronidasa, la que a su vez produce una precipitación azul asociada con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por *E. coli* y coliformes fermentadores de lactosa. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, representado por colonias entre azules y rojo-azules asociadas con el gas atrapado en la Placa Petrifilm EC (dentro del diámetro aproximado de una colonia). (3M petrfilm, Placas de recuento EC, 2023)

La AOAC Internacional y el Manual de An. lisis Bacteriológico de la FDA de los Estados Unidos definen los coliformes como colonias de bastoncillos Gramnegativos que producen ácido y gas de la lactosa durante la fermentación metabólica de la lactosa. Las colonias coliformes, que crecen en la Placa Petrifilm EC, producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de coliformes confirma su presencia. (3M petrfilm, Placas de recuento EC, 2023)

En este método se forman colonias coliformes con una o más burbujas de gas. No es necesaria ninguna confirmación adicional porque la producción de gas a partir de la fermentación de la lactosa por colonias resistentes a las sales biliares es una característica de los coliformes y se supone que resulta de la fermentación de la lactosa en el medio. (Salfinger & Tortorello, 2015, pág. 111)

### ***Utilización de Placas Petrifilm 3M***

- Prepara la muestra.
- Inocular y distribuir 1 ml de la muestra sobre la placa Petrifilm.
- Incubar a la temperatura apropiada.
- Contar todas las colonias.

### ***Ventajas de las Placas Petrifilm 3M***

- No hay necesidad de preparar medio de cultivo.
- No hay necesidad de esterilizar ni de fundir medios de cultivo.
- Altamente selectivos genera una mayor precisión en la obtención de resultados. En las Placas Petrifilm sólo crecen el tipo de microorganismo indicador que se está evaluando.
- Ocupan menos espacio en la incubadora que las cajas Petri.
- Disponibilidad de la Placa Petrifilm 3M para la identificación simultanea de *E. coli* se puede evidenciar la producción de gas a partir de la fermentación de la lactosa por medio de gas alrededor de la colonia, lo cual nos permite identificarlas más fácilmente de otros microorganismos que puedan crecer en este medio.
- Se reducen los riesgos de error, que se generan al momento de preparar un medio de cultivo.
- Reducción de tiempo y mano de obra, lo cual se traduce en aprovechamiento del personal en actividades complementarias que permitan mejorar los procesos y garantizar los estándares de calidad.

- El tiempo de obtención de resultados es de 48 horas.
- Existe una mejor recuperación bacteriana ya que no se somete a la muestra a choque térmico haciendo que los recuentos sean más precisos y confiables.
- Se puede conservar mayor tiempo las placas de Petrifilm inoculadas sin ser contaminadas; en comparación a los medios de cultivo preparados, ya que quedan expuestas a otros microorganismos.
- Elimina por completo la exudación que se genera en las cajas de Petri, por el metabolismo propio de los microorganismos.
- Mejor recuento de colonias puntiformes, mejorando la calidad del análisis.
- Liberación rápida y oportuna de lotes de alimentos para su comercialización y distribución.
- Cada paquete viene acompañado de un certificado de conformidad y de una ficha técnica que permite obtener una información clara sobre su uso e interpretación.
- Calidad estandarizada, solo se pueden generar errores por causa del analista.
- Menor volumen de desperdicio.
- Disminuye el uso de equipos como autoclaves, material de vidrio, neveras.

(Alonso, Priveda, 2008, págs. 158-160)

### ***Desventajas de las Placas Petrifilm 3M***

- Se debe tener cuidado al momento de dispersar la muestra para evitar que se derrame.

- Se generan burbujas de aire, si al momento de dejar caer el film superior se realiza demasiado rápido. (Alonso, Priveda, 2008)

## **Validación de métodos**

### ***Definición***

La validación de métodos es un proceso mediante el cual un laboratorio confirma mediante evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para usos específicos. Sirve para demostrar que el método puede detectar e identificar un analito o analitos. (FDA, 2019, pág. 4)

La Guía Eurachem define que la validación de un método es “básicamente el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas”. (Magmusson & Ornemark, 2014)

### ***¿Cuándo debe validarse un método?***

Según la Guía Eurachem un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para cumplir con los requisitos en relación con el uso dado o la aplicación. La extensión de la validación dependerá de la aplicación, la naturaleza de los cambios realizados y de las circunstancias en que el método se va a utilizar.

También debe validarse cuando es necesario demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos por dos métodos, por ejemplo, un método recientemente desarrollado y un método normalizados existente. (Magmusson & Ornemark, 2014, pág. 12)



### ***Etapas en el proceso de validación***

El proceso de validación de un método debe estar cuidadosamente planificado, por ello deben contemplarse los siguientes pasos:

- Conocer el problema analítico a resolver.
- Planificar las acciones a seguir.
- Llevar a cabo la validación y evaluar los resultados obtenidos, por comparación con los parámetros de desempeño establecidos.
- Realizar el Informe de validación. (Camaró Sala et al., 2013, pág. 12)

Existen dos modalidades o tipos de validación en función de que se realice sobre un tipo de método u otro. En función del método que se emplee, los requisitos de validación varían. Así, se definen la validación primaria y la secundaria o verificación.

### ***Tipos de métodos de validación***

Es responsabilidad del laboratorio utilizar los métodos apropiados para el propósito, según el alcance requerido. Estos métodos pueden ser normalizados, no normalizados o desarrollados por el propio laboratorio. (OGA - Oficina de Acreditación Guatemalteca, C.A., 2023, pág. 4)

**Métodos normalizados.** Las normas de calidad y regulaciones frecuentemente requieren el uso de métodos normalizados. A la vez, el uso de métodos normalizados es deseable en situaciones en las que el método será ampliamente utilizado; sin embargo, algunas veces el laboratorio puede contar con un método propio más adecuado para el propósito. Los métodos normalizados deben ser utilizados por el laboratorio exactamente como están descritos. (OGA - Oficina de Acreditación Guatemalteca, C.A., 2023, pág. 5)

**Métodos No Normalizados.** Los métodos no normalizados deben estar apropiadamente validados para poder utilizarlos, ya sean éstos desarrollados por un tercero o resultado de la modificación de un método normalizado. En el caso de modificaciones, es necesario demostrar que éstas no tienen una repercusión sobre la calidad de los resultados. (OGA - Oficina de Acreditación Guatemalteca, C.A., 2023, pág. 5)

**Métodos Desarrollados por el Laboratorio.** Cuando sea el caso, el laboratorio debe demostrar que tiene un plan en el que se incluye la evaluación de su capacidad en cuanto a personal, equipo y demás recursos que le permitan desarrollar métodos propios.

(OGA - Oficina de Acreditación Guatemalteca, C.A., 2023, pág. 6)

## **Técnicas para la validación**

Para la validación es conveniente utilizar una o varias de las técnicas siguientes para la determinación del desempeño de un método: a) contaminación de muestras artificialmente. El proceso consiste en la preparación de una muestra agregando el material interferente a una muestra real que contenga el material a ensayar, b) uso de materiales de materiales y/o certificados. Esta alternativa tiene algunos inconvenientes como el elevado coste económico, la posibilidad y facilidad de encontrar un material de referencia suficientemente representativo de la muestra a validar, c) comparación de resultados obtenidos con otros métodos alternativos. Se analizan muestras de pacientes por el método en estudio y otro método de comparación, luego se estima el error sistemático basándose en las diferencias observadas entre ambos métodos. El método de comparación debería ser el de referencia (Gold standard), d) comparaciones inter laboratorios. Esta sistemática se basa en la utilización de resultados de inter comparaciones en las que haya participado el laboratorio, y utilizar estos datos como valores de referencia. (Camaró Sala et al., 2013, pág. 20)

## **Tipos de métodos microbiológicos**

Los métodos microbiológicos se clasifican en: a) métodos cualitativos para la presencia o ausencia de microorganismos. Comúnmente, los métodos cualitativos se evalúan mediante el uso de turbidez u otros cambios relacionados con el crecimiento en un medio de cultivo, como evidencia de la presencia de microorganismos viables en una muestra de prueba, b) métodos cuantitativos para la enumeración de microorganismos, como una prueba de recuento total de viables o citometría de flujo, c) pruebas de identificación, Esto incluye la caracterización morfológica y bioquímica, como reacciones bioquímicas, utilización de sustratos de carbono, caracterización de la composición de ácidos grasos, patrones de bandas de endonucleasas de restricción y uso de 16S o análisis de secuencia de ADN. (Sandle, 2015)

En los métodos cualitativos el objetivo de la validación es asegurar que: a) se detectan las muestras positivas hasta un nivel de positividad bajo; b) no se obtienen falsos positivos que podrían dar lugar a un resultado erróneo. Por ello, los parámetros más adecuados para evaluar el o cualitativos:

- Límite de detección: es la manera de asegurar que el método es capaz de detectar e identificar la presencia de microorganismos diana, en muestras con poca carga microbiana.
- Parámetros que tengan que ver con la correcta detección del método: sensibilidad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos, eficiencia.

(Camaró Sala et al., 2013, pág. 6)

En los métodos cuantitativos los parámetros para tener en cuenta serán:

- Precisión referida a la reproducibilidad.
- Exactitud definida como recuperación. Este parámetro se considera fundamental para la evaluación del Control Interno de Calidad.
- Rango: se validará en el rango de trabajo (placa contable). (Camaró Sala et al., 2013)

### **Variabilidad con métodos microbiológicos**

Los métodos que caen dentro de las tres categorías descritas tienen cierto grado de variabilidad y, con estas variaciones, los métodos microbiológicos son inherentemente diferentes de los analíticos. La razón de la variación es que la microbiología es una ciencia logarítmica. Los métodos microbiológicos son capaces de distinguir entre 100 y 1000 células (1 log), pero no diferencias más pequeñas, como 0,3 o 0,5 log. (Sandle, 2015, pág. 2)

### **Recuperación del método**

La validación microbiana basada en cultivos está limitada por la capacidad de los microorganismos para reproducirse bajo un conjunto de condiciones en relación con la preparación, el cultivo y la incubación de las muestras. Por lo tanto, cualquier método es sólo un indicador general. Muchas variables pueden afectar la recuperación. Éstas incluyen: medios de crecimiento, la unidad formadora de colonias o “UFC” no es un recuento celular

verdadero, condiciones de incubación (temperatura y tiempo), requerimiento nutricional del organismo, errores de dilución, es poco probable que los organismos ambientales se recuperen cuando están en la fase de crecimiento exponencial (el crecimiento exponencial conduce a una mejor recuperación). (Sandle, 2015, pág. 3)

## **Protocolo e Informe de validación**

### ***Protocolo de validación***

Para realizar la validación, en primer lugar, es necesario diseñar el plan de validación, ello puede reflejarse en un “protocolo de validación”. La primera evidencia del proceso de validación la proporciona el protocolo. Este documento se corresponde con un plan de trabajo para llevar a cabo la validación. En él se recogen los experimentos que se van a realizar, cuándo se desarrollarán, las personas responsables de llevarlos a cabo, el material que se empleará. El protocolo debe elaborarse previamente a la validación, ya que su finalidad es establecer los objetivos experimentales de la validación este debería incluir el siguiente contenido mínimo: a) responsable, persona que diseña y aprueba la validación, b) objetivo del protocolo, c) alcance, d) personal que llevará a cabo la validación, e) metodología y diseño experimental, f) listado de equipos, instrumentos, materiales, medios de cultivo, reactivos y cepas de referencia, g) condiciones ambientales, cuando corresponda, h) parámetros de desempeño a determinar. En función de las características del método (cualitativo/cuantitativo, normalizado/no normalizado), i) criterios de aceptación para cada uno de los parámetros, j) análisis estadístico, k) metodología para el cálculo de la incertidumbre, y l) registros asociados.

### ***Informe de validación***

Debe reflejar el protocolo de validación e incluir, además de lo especificado en el protocolo de validación a) Resultados obtenidos b) Conclusiones (Camaró Sala et al., 2013, pág. 13)

### **Parámetros de desempeño del método**

La Guía EURACHEM (2016), menciona que el laboratorio tiene que decidir cuáles de los parámetros de desempeño del método necesitan caracterizarse con el fin de validar el método.

### ***Repetibilidad***

La repetibilidad está dentro de la precisión del laboratorio, designada como  $S_r$  o la proximidad de acuerdo entre resultados sucesivos e independientes obtenidos por el mismo método en material de prueba idéntico, bajo las mismas condiciones (por ejemplo, aparato, operador, laboratorio y tiempo de incubación). (Feldsine et al., 2002)

Esta es la variación en los resultados obtenidos en la misma muestra cuando el mismo técnico la analiza repetidamente con una prueba o dentro de un corto período de tiempo, utilizando los mismos reactivos y equipos.

La clave de la aceptabilidad es la cantidad de variación. Puede expresarse como: Desviación estándar, coeficiente de variación (desviación estándar relativa), intervalo de confianza de la media, con pruebas específicas, como sistemas de identificación microbiana, se utilizarán otros criterios para determinar la similitud de los organismos recuperados. (Sandle, 2015, pág. 12)

### ***Reproducibilidad***

La reproducibilidad es entre la precisión de los laboratorios, designada  $S_R$ , o la cercanía de la concordancia entre los resultados de una sola prueba en material de prueba idéntico usando el mismo método y obtenido por diferentes operadores. (Feldsine et al., 2002)

Esta es la variación en los resultados obtenidos en la muestra cuando se analiza en varias ocasiones distintas por diferentes técnicos utilizando diferentes reactivos y equipos. Esto muestra reproducibilidad. Esto puede expresarse como: Desviación estándar, coeficiente de variación (desviación estándar relativa), intervalo de confianza de la media, con pruebas específicas, como sistemas de identificación microbiana, se utilizarán otros criterios para determinar la similitud de los organismos recuperados. (Sandle, 2015)

### ***Porcentaje de recuperación***

La incertidumbre en las mediciones microbiológicas puede estimarse observando la recuperación a lo largo del tiempo. En microbiología está bien documentado que muchos organismos se comportan de manera consistente, por lo que esta expectativa a menudo se cumple. Las diferencias de recuperación a lo largo del tiempo deben reflejar los diversos componentes de la incertidumbre. (Feldsine et al., 2002)

La diferencia entre los recuentos de las muestras de placa sin matriz y de placa con matriz es una medida de recuperación del organismo, generalmente expresada como porcentaje del recuento de UFC en la muestra inoculada, los pasos para estimar el porcentaje de recuperación son los siguientes:



- Paso 1. Transformar los valores a log10.
- Paso 2. Calcular el % de recuperación de los valores log10 dividiendo el recuento obtenido por el valor obtenido y multiplicarlo por 100.

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

### ***Incertidumbre***

Para evaluar la incertidumbre de un método, se identifican los posibles componentes (condiciones) de la incertidumbre. Luego se obtienen datos para estimar los componentes de la incertidumbre. Puede que no sea práctico o posible estimar todos los componentes de la incertidumbre.

**Proceso para evaluar la incertidumbre de la medición.** El proceso para evaluar la medición de la incertidumbre incluye:

a) identificar los analitos objetivo, incluidas las unidades (mensurando), b) identificar los posibles componentes de incertidumbre, c) identificar el mejor modelo para evaluar la incertidumbre de la medición según el método, los datos disponibles, las necesidades y el uso de la incertidumbre de la medición. Los modelos incluyen:

- Incertidumbre técnica: es la variabilidad operativa asociada con los pasos técnicos del método.

- Réplicas de recuperación: son la comparación de la recuperación de un organismo con y sin matriz. Este modelo se usa cuando la muestra de control de laboratorio no tiene el mismo nivel de concentración en cada corrida.
- Réplicas de reproducibilidad intra-laboratorio, también conocidas como réplicas de precisión intermedia: las réplicas de reproducibilidad intra-laboratorio son muestras de control configuradas en réplica o muestras reales recibidas por duplicado y analizadas, con cada ejecución analítica. Este modelo podría utilizarse cuando se necesiten declaraciones de conformidad.
- Estudio de validación MU: El estudio de validación MU utiliza los datos técnicos de la validación del método para calcular la incertidumbre del método validado. Este modelo se utiliza cuando se dispone de datos de validación y la MU resultante satisface las necesidades del laboratorio.

d) Calcular la incertidumbre expandida.

- Paso 1: Transformar los datos sin procesar tomando el  $\log_{10}$  de los datos.
- Paso 2: Calcular la diferencia entre las réplicas transformadas.
- Paso 3: Cuadrar las diferencias entre las réplicas transformadas.
- Paso 4: Sumar las diferencias y dividir por  $2n$ , donde  $n$  = el número total de pares de réplicas.
- Paso 5: Calcular la raíz cuadrada del resultado en el paso 4; esto equivale a la desviación estándar de reproducibilidad intra-laboratorio.

- Paso 6: Para proporcionar un rango más alto de valores que cubra lo que es probable que se observe, aplique el factor de cobertura ( $k=2$  para una cobertura del 95%) a la desviación estándar de reproducibilidad. (Tenga en cuenta que este es un valor  $\log_{10}$ ).
- Paso 7: Para calcular la incertidumbre de cualquier resultado determinado, el resultado primero se convierte al valor  $\log_{10}$  y luego se suma y resta la incertidumbre expandida del resultado  $\log$ .
- Paso 8. Para estimar la MU de una muestra, convierta el valor logarítmico de la medición de la muestra a unidades base (UFC) para el resultado informado. Esto se logra tomando el anti-log de los puntos finales del intervalo (anti-log de  $x = 10^x$ ).

## **Técnica oficial de la AOAC 986.33: Recuento de EC en la leche (Métodos de película seca rehidratable)**

### ***Principio***

El método utiliza placas de cultivo bacteriano de medio seco y gel soluble en agua fría. Las porciones de prueba sin diluir o diluidas se agregan directamente a las placas a razón de 1,0 ml por placa. Cuando se aplica presión a un esparcidor de plástico colocado sobre una película superpuesta, se extiende la suspensión de prueba sobre un área de crecimiento de aproximadamente 20 cm<sup>2</sup>. Se permite que el agente gelificante se solidifique y las placas se incuban y luego se cuentan. Se puede utilizar una pipeta o una jeringa de pipeteo continuo con asa de placa para la adición de la porción de prueba para los análisis de recuento de bacterias.

### ***Aparatos***

**Placas Petrifilm para recuento de aerobio.** Las placas contienen nutrientes para medios de métodos estándar, agente gelificante soluble en H<sub>2</sub>O frío revestido sobre la base de la película, película superpuesta recubierta con agente gelificante y 2,3 Indicador de cloruro de 5-trifeniltetrazolio. El área de crecimiento circular de una sola placa contiene aproximadamente veinte cuadrados de 1 cm delineados en la base de la película. Las placas de recuento de aerobios Petrifilm (Microbiology Products, 3M Center, Bldg 275-5W-05, St. Paul, MN 55144, EE. UU.) o equivalentes cumplen con estas especificaciones.

**Placas Petrifilm para recuento de EC.** Las placas contienen nutrientes de bilis rojo violeta que cumplen con los estándares de la APHA, tal como se indica en el Compendio de métodos para el examen microbiológico de los alimentos (1990), 3.<sup>a</sup> edición, Asociación Estadounidense de Salud Pública, Washington, DC, EE. UU., frío Gelificante soluble en H<sub>2</sub>O y cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio. Las placas de recuento de coliformes Petrifilm (Microbiology Products, 3M Center) o equivalentes cumplen con estas especificaciones.

**Esparcidor de plástico.** Provisto con placas Petrifilm, consta de un lado cóncavo y un lado liso y plano, diseñado para esparcir la porción de prueba de leche uniformemente sobre el área de crecimiento de la placa.

**Pipetas.** Calibradas para uso bacteriológico con jeringa de pipeteo continuo.

**Contador de colonias.** Aparato estándar, se prefiere el modelo de Quebec, o uno que proporcione una magnificación y visibilidad equivalentes.

### ***Análisis***

**Recuento de colonias *E. coli*.** Utilizar placas de conteo aeróbico de Petrifilm 3M (EC). Colocar el plato sobre una superficie plana. Levantar la película superior e inocular una porción de prueba de 1 ml en el centro de la base de la película. Enrollar con cuidado la película superior sobre el inóculo. Distribuir la porción de prueba sobre el área de crecimiento prescrita con presión hacia abajo en el centro del dispositivo esparcidor de plástico (lado empotrado hacia abajo). Dejar la placa en reposo durante 1 minuto para permitir que el gel se solidifique. En placas de cuba  $48 \pm 3$  h a  $32^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ .

En la incubadora, colocar las placas en posición horizontal, con el lado claro hacia arriba, en pilas que no excedan las 10 unidades. Contar las placas inmediatamente después del período de incubación. Una vez finalizada la incubación, las placas se pueden almacenar congeladas ( $\leq -15$  °C) hasta 7 días. Esto debe evitarse como una práctica de rutina.

Usar un contador de colonias estándar para fines de conteo. También se puede utilizar una lupa-iluminador para facilitar el conteo. Las colonias se tiñen en varios tonos de rojo. Cuente todas las colonias en el rango contable (30–300 colonias).

Para calcular el conteo de bacterias, multiplique el número total de colonias por placa (o el número promedio de colonias por placa si cuenta placas duplicadas de la misma dilución) por el recíproco de la dilución utilizada. Al contar colonias en placas duplicadas de diluciones consecutivas, calcule el número medio de colonias para cada dilución antes de determinar el recuento bacteriano promedio. Los recuentos estimados se pueden realizar en placas con más de 300 colonias y deben informarse como recuentos estimados. Al hacer tales conteos, se puede considerar que el área de crecimiento circular contiene alrededor de veinte cuadrados de 1 cm. Para aislar colonias para una mayor identificación, levantar la película superior y tome la colonia del gel.

## **Metodología de la Investigación**

Para realizar este estudio se utilizó un enfoque cuantitativo con un nivel de investigación descriptivo y un diseño prospectivo, experimental, transversal, con una metodología hipotética deductiva y técnicas de recopilación y análisis.

### **Universo**

Leche humana pasteurizada proveniente de madres en estado de lactancia recolectada a través del programa de donación de leche materna del laboratorio del Banco de leche del Hospital Regional de Occidente.

### **Participantes**

120 pruebas para la determinación de *E. coli* en muestras de leche humana pasteurizada que cumplieron con los criterios de inclusión, dividida en tres niveles de inóculos conocidos y un control negativo.

### ***Criterios de inclusión***

- Muestras que se encuentren almacenadas en un envase íntegro
- Muestras que cumplan los parámetros de inocuidad y pasteurización por el Banco de Leche del Hospital Regional de Occidente
- Muestras que cumplan con un etiquetado correcto

### ***Criterios de exclusión***

- Muestras que no cumplan con los parámetros de inocuidad y pasteurización.
- Muestras que se encuentren en almacenadas en envases sucios, de metal, o que presenten algún daño físico.
- Muestras que se observe visualmente contaminación por objetos.

### **Diseño estadístico**

Se utilizó la desviación estándar para la variación en los resultados obtenidos en la muestra de leche humana cuando se analiza en varias ocasiones distintas por diferentes analistas y el porcentaje de recuperación para la diferencia entre los recuentos de las muestras en placas Petrifilm para recuento de *E. coli* y coliformes en los 3 niveles de inóculo. Utilizando el cuadro de diferencia entre replicas para obtener los resultados.

### **Instrumento**

Se empleará la técnica analítica AOAC 986.33, como referencia para el recuento *E. coli* a través Placas Petrifilm 3M.

### **Material y Equipo:**

- Muestras de leche materna pasteurizada
- Frascos de vidrio estériles con rosca
- Tubos de ensayo de vidrio con rosca
- Placas Petrifilm 3M EC



- Esparcidor de bacterias
- Pipetas automática estériles y calibradas de 100 – 1000 ul
- Pipetas automáticas estériles y calibradas de 10 – 100 ul
- Pipetas automáticas estériles y calibradas de 5 – 50 ul
- Puntas estériles para pipetas automáticas
- Campana de flujo laminar tipo A2
- Incubadora de 32 – 35 celsius
- Solución salina
- Caldo Trypticase Soya (CST)
- Agar para Recuentos en Placa (PCA)
- Cajas petri de plástico
- Cepa *E. Coli* ATCC 25922
- Alcohol etílico al 70 %
- Guantes estériles
- Cinta testigo
- Tijeras, marcadores.

### **Metodología de análisis**

Se solicitó la autorización al:

- Comité de investigación del Hospital Regional de Occidente para la realización de la investigación
- Banco de Leche del Hospital Regional de Occidente
- Laboratorio del Hospital Regional de Occidente para el uso de sus instalaciones y equipo.

### **Metodología para la recepción muestra de leche materna pasteurizada**

Las muestras de leche son procesadas y proporcionadas por el Banco de Leche del Hospital Regional de Occidente, las cuales se verificó que cumplieran con los criterios de inclusión.

Se recogieron las muestras en las fechas programadas las cuales fueron transportadas en cadena de frío y llevadas al laboratorio de Microbiología ubicado en el mismo lugar.

### **Metodología para la esterilización del equipo y área**

Todo el material que se requiere estéril se envolvió en papel Kraft colocándole cinta testigo, una vez preparado el material se coloca en la autoclave en un ciclo normal. Para todo el proceso se trabajó en campana de flujo laminar tipo A2, antes de utilizar la campana de flujo laminar se desinfecto con alcohol al 70%.

### **Metodología para la preparación del inóculo**

Se inculó colonias de *E. coli* ATCC 25922 en un tubo de ensayo con 10 ml de Caldo Tripticasa Soya (CST) en duplicado; se incubó a 35 °C por 16 horas. Luego se centrifugó a 5,000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregó 7 ml de solución salina isotónica (0.85 a 0.90%), se tapa el tubo y se invierte 10 veces para lavar las bacterias y se vuelve a centrifugar con las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Este procedimiento de lavado se repitió una vez más y se volvió a re suspender con 7 ml de solución salina.

De este tubo concentrado se realizaron diluciones seriadas 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000, se sembró cada dilución en placa Petrifilm EC, se incubó a 35 C. durante 48 horas para conocer la concentración inicial del inculó concentrado, donde se obtuvo los tres niveles de inculó de trabajo para las concentraciones de a)10,000 – 50,000 UFC/ml, b)50,000 – 250,000 UFC/ml y c)250,000 – 1,200,000 UFC/ml.

### **Metodología para la preparación de muestras inoculadas artificialmente con *E. coli***

Las muestras de leche humana pasteurizada fueron proporcionadas a través del Banco de Leche del Hospital Regional de Occidente y transportadas en cadena de frío. Siendo un total de cuatro muestras diferentes, identificadas como muestra 1, muestra 2, muestra 3 y una muestra 4.

Las muestras son colocadas en la campana de flujo laminar A2 y se dejaron hasta que se descongelaron y atemperaron a temperatura ambiente.

A las muestras 1, 2 y 3 se les agrego la cantidad de inóculo correspondiente para cada uno de los niveles de trabajo descritos anteriormente y para la muestra 4 se dejó sin inocular ya que esta muestra fue tomada como el control negativo.

### **Metodología para la inoculación en Placas Petrifilm 3M para recuento de *E. coli***

Una vez inoculadas las muestras de leche humana con el inóculo concentrado se agitaron en forma circular 10 veces, se colocaron las Placas Petrifilm 3M en la campa de flujo laminar A2 y se procedió a inocular siguiendo las instrucciones del inserto del fabricante de placas Petrifilm 3M (Ver anexo), se incubaron durante  $48h \pm 2h$  a  $35 C \pm 1C$ .

Para el control negativo, se inoculó 1 ml de leche humana libre del inóculo concentrado (muestra 4) siguiendo el procedimiento descrito en el párrafo anterior.

### **Interpretación de resultados**

#### ***Placas Petrifilm EC***

La presencia de colonias color azul son indicativos de la presencia de *E. coli*, se puede observar la presencia de pequeñas colonias con formación de gas y colonias rojas con gas para coliformes.

Una alta presencia de *E. coli* puede causar que el área de crecimiento se vea de color azul-purpura.

Se realiza el conteo de las placas Petrifilm. Los recuentos se multiplicarán por su factor de dilución para obtener UFC/ml. Después estos valores se pasaron a  $\log_{10}$  para

tener el dato de log 10 UFC/ML inoculados y recuperados para las muestras de leche humana pasteurizada.

Para el control negativo se espera que no haya crecimiento UFC.

## **Análisis estadístico**

### ***Reproducibilidad, repetibilidad intra-laboratorio e incertidumbre expandida***

- Paso 1: Los datos de la réplica 1 y 2 sin procesar se transforman a logaritmo base 10.
- Paso 2: Se realiza la resta de los logaritmos obtenidos (diferencia entre réplicas) y se calcula la media.
- Paso 3: Se eleva al cuadrado la diferencia entre réplicas transformadas.
- Paso 4: Se calcula la raíz cuadrada del resultado del paso anterior.
- Paso 5: Se convierte la desviación estándar en una desviación estándar relativa dividiendo por la media.
- Paso 6: Para calcular la incertidumbre, primero se convierte el resultado al valor log10, multiplicado por 0.131250 y luego esta incertidumbre expandida es sumado y restado del valor de registro como Log 10.
- Paso 7: Para proporcionar un rango de valores más alto que cubra lo que probablemente se observará en otras muestras, aplique el factor de cobertura ( $k=2$  para una cobertura del 95%) a la RSD para obtener la estimación de la Incertidumbre Expandida.

Se usa el resultado logarítmico en base 10 para facilitar el cálculo. La conversión a base logarítmica 10 es necesaria debido a la naturaleza de la bacteria (Colonia Unidades Formadoras o UFC), que se reproduce exponencialmente y el esquema de dilución que se determina por dilución en serie.

### ***Porcentaje de recuperación***

- Paso 1. Se transforman los valores a  $\log_{10}$ .
- Paso 2. Se calcula el porcentaje de recuperación de los valores  $\log_{10}$  dividiendo el recuento obtenido por el valor obtenido y multiplicarlo por 100.

### **Tabulación de los datos**

Para la tabulación de los datos se utilizó el programa de Microsoft Office Excel 365.

## Análisis estadístico

Tabla 1

### Parámetros y criterios para la validación de pruebas

Parámetros	Validación	Pruebas por realizar/análisis de los datos	Criterios
Repetibilidad	X	No. De repeticiones por analista y matriz: 30  No. Días: 3  No. Analistas: 1  Niveles de inóculo: 3  Matriz:  AOAC986.33  <i>E. coli</i> : Leche humana pasteurizada	$r < 3$
Reproducibilidad	X	Análisis Estadístico de los datos: Calcular r No. De repeticiones por analista y matriz: 30  No. Días: 3  No. Analistas: 2  Niveles de inóculo: 3  Matriz:  AOAC986.33  <i>E. coli</i> - Leche humana pasteurizada	$R < 3$
Recuperación	X	Estadístico de los datos: Calcular R a pasteurizada Se utilizaron datos generados en la prueba de reproducibilidad	90-110%
Incertidumbre	X	Análisis estadístico de los datos: calcular % de recuperación Se utilizarán datos generados en la prueba de reproducibilidad.  Análisis estadístico de los datos: según cálculos G108 – Guidelines for estimating Uncertainty for Microbiological Counting Methods	

Fuente: Elaboración propia para la investigación titulada Validación del método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *Escherichia coli* en leche humana, bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente

## Resultados

En este estudio se evaluaron cuatro muestras de leche humana pasteurizada identificadas como muestra 1, muestra 2, muestra 3 a diferentes niveles de inóculo y un control negativo como muestra 4. Las cuales fueron procesadas en el Laboratorio del Hospital Regional de Occidente ubicado en el municipio de Quetzaltenango, se utilizó como técnica analítica AOAC 986.33 donde se evaluaron los parámetros de desempeño: reproducibilidad, repetibilidad, incertidumbre expandida y porcentaje de recuperación en el mes de mayo del 2023 (cuadro 1 y 2).

Cuadro 1

### *Reproducibilidad, repetibilidad intra-laboratorio e incertidumbre expandida*

No. de muestras	No. UFC/mL						log <sub>10</sub>						Diferencia entre réplicas			Cuadrado de diferencia entre réplicas				
	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 1			Réplica 2			1	2	3	1	2	3		
	0	1	2	3	0	1	2	3	Inóculo 1	Inóculo 2	Inóculo 3	Inóculo 1							Inóculo 2	Inóculo 3
1	0	12	26	30	0	3	15	24	1.07918	1.41497	1.47712	0.47712	1.17609	1.38021	0.60206	0.23888	0.09691	0.36248	0.05706	0.00939
2	0	10	26	45	0	7	26	27	1.00000	1.41497	1.65321	0.84510	1.41497	1.43136	0.15490	0.00000	0.22185	0.02399	0.00000	0.04922
3	0	12	15	50	0	8	25	52	1.07918	1.17609	1.69897	0.90309	1.39794	1.71600	0.17609	-0.22185	-0.01703	0.03101	0.04922	0.00029
4	0	12	34	44	0	7	20	48	1.07918	1.53148	1.64345	0.84510	1.30103	1.68124	0.23408	0.23045	-0.03779	0.05479	0.05311	0.00143
5	0	10	25	50	0	6	26	52	1.00000	1.39794	1.69897	0.77815	1.41497	1.71600	0.22185	-0.01703	-0.01703	0.04922	0.00029	0.00029
6	0	10	20	44	0	2	21	44	1.00000	1.30103	1.64345	0.30103	1.32222	1.64345	0.69897	-0.02119	0.00000	0.48856	0.00045	0.00000
7	0	11	26	52	0	4	23	48	1.04139	1.41497	1.71600	0.60206	1.36173	1.68124	0.43933	0.05325	0.03476	0.19301	0.00284	0.00121
8	0	10	34	43	0	6	21	27	1.00000	1.53148	1.63347	0.77815	1.32222	1.43136	0.22185	0.20926	0.20210	0.04922	0.04379	0.04085
9	0	13	20	50	0	6	25	48	1.11394	1.30103	1.69897	0.77815	1.39794	1.68124	0.33579	-0.09691	0.01773	0.11276	0.00939	0.00031
10	0	9	26	52	0	6	33	48	0.95424	1.41497	1.71600	0.77815	1.51851	1.68124	0.17609	-0.10354	0.03476	0.03101	0.01072	0.00121
Media												0.88927	1.37633	1.63115	0.29088	0.02713	0.05363	0.12106	0.02269	0.01042
Reproducibilidad intralaboratorio (S <sub>R</sub> )																		0.06053	0.01134	0.00521
Repetibilidad intralaboratorio (S <sub>i</sub> )																		0.024603	0.1065	0.07218
Incertidumbre expandida																		0.027667	0.07738	0.04425
Media de incertidumbre expandida																		0.27611	0.07723	0.04416

Fuente: diseño propio.

Nota de tabla: Para calcular la incertidumbre de cualquier valor subsecuente del laboratorio el resultado debe convertirse a su log<sub>10</sub> multiplicado por 0.13250 y luego esta incertidumbre expandida es adicionada o restada del resultado expresado como log<sub>10</sub>



Cuadro 2

*Porcentaje de Recuperación*

CFU/mL teórico	CFU/mL recuperado	Log 10		Recuperación (%)
		Teórico	Recuperado	
10	12	1.00000	1.07918	107.92
10	10	1.00000	1.00000	100.00
10	12	1.00000	1.07918	107.92
10	12	1.00000	1.07918	107.92
10	10	1.00000	1.00000	100.00
10	10	1.00000	1.00000	100.00
10	10	1.00000	1.00000	100.00
10	11	1.00000	1.04139	104.14
10	10	1.00000	1.00000	100.00
10	13	1.00000	1.11394	111.39
10	9	1.00000	0.95424	95.42
10	3	1.00000	0.47712	47.71
10	7	1.00000	0.84510	84.51
10	8	1.00000	0.90309	90.31
10	7	1.00000	0.84510	84.51
10	6	1.00000	0.77815	77.82
10	2	1.00000	0.30103	30.10
10	9	1.00000	0.95424	95.42
10	6	1.00000	0.77815	77.82
10	6	1.00000	0.77815	77.82
25	26	1.39794	1.41497	101.22
25	26	1.39794	1.41497	101.22
25	15	1.39794	1.17609	84.13
25	34	1.39794	1.53148	109.55
25	25	1.39794	1.39794	100.00
25	20	1.39794	1.30103	93.07
25	26	1.39794	1.41497	101.22
25	34	1.39794	1.53148	109.55
25	20	1.39794	1.30103	93.07
25	26	1.39794	1.41497	101.22
25	15	1.39794	1.17609	84.13
25	26	1.39794	1.41497	101.22
25	25	1.39794	1.39794	100.00
25	20	1.39794	1.30103	93.07

25	26	1.39794	1.41497	101.22
25	21	1.39794	1.32222	94.58
25	23	1.39794	1.36173	97.41
25	21	1.39794	1.32222	94.58
25	25	1.39794	1.39794	100.00
25	33	1.39794	1.51851	108.63
50	30	1.69897	1.47712	86.94
50	45	1.69897	1.65321	97.31
50	50	1.69897	1.69897	100.00
50	44	1.69897	1.64345	96.73
50	50	1.69897	1.69897	100.00
50	44	1.69897	1.64345	96.73
50	52	1.69897	1.71600	101.00
50	43	1.69897	1.63347	96.14
50	50	1.69897	1.69897	100.00
50	52	1.69897	1.71600	101.00
50	24	1.69897	1.38021	81.24
50	27	1.69897	1.43136	84.25
50	52	1.69897	1.71600	101.00
50	48	1.69897	1.68124	98.96
50	52	1.69897	1.71600	101.00
50	44	1.69897	1.64345	96.73
50	48	1.69897	1.68124	98.96
50	27	1.69897	1.43136	84.25
50	48	1.69897	1.68124	98.96
50	48	1.69897	1.68124	98.96
<b>Media</b>				<b>94.46</b>
<b>D.S.</b>				<b>13.39</b>

Fuente: Elaboración propia para la investigación titulada Validación del método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *Escherichia coli* en leche humana, bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente

Tabla 2

*Repetitividad*

	Inóculo 1	Inóculo 2	Inóculo 3
	10 UFC / ml	25 UFC / ml	50 UFC / ml
	Teórico	Teórico	Teórico
Repetibilidad intra-laboratorio ( $S_{I_r}$ )	0.27667	0.07738	0.04425
Criterio de aceptación para ( $S_{I_r}$ )	< 3		

Fuente: Elaboración propia para la investigación titulada Validación del método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *Escherichia coli* en leche humana, bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente.

Para el parámetro de repetibilidad se realizaron 30 pruebas por cada nivel de inóculo, bajo las mismas condiciones de trabajo. Obteniendo un total de 90 pruebas para este estudio obteniendo un coeficiente de variación menor al 3%.

Tabla 3

## Coeficiente de reproducibilidad:

	Inóculo 1	Inóculo 2	Inóculo 3
	10 UFC / ml	25 UFC / ml	50 UFC / ml
	Teórico	Teórico	Teórico
Reproducibilidad intra-laboratorio ( $S_{I_R}$ )	0.24603	0.10650	0.07218
Criterio de aceptación para ( $S_{I_R}$ )	< 3		

Fuente: Elaboración propia para la investigación titulada Validación del método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *Escherichia coli* en leche humana, bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente.

Tabla 4

*Porcentaje de recuperación*

% de recuperación	94.46%
Criterio de aceptación	90-110%

Fuente: Elaboración propia para la investigación titulada Validación del método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *Escherichia coli* en leche humana, bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente

Tabla 5

*Incertidumbre*

	Inóculo 1	Inóculo 2	Inóculo 3
	10 UFC / ml	25 UFC / ml	50 UFC / ml
	Teórico	Teórico	Teórico
Incertidumbre expandida	0.27611	0.07723	0.04416
Media de incertidumbre expandida		0.1325	
Criterio de aceptación			

Fuente: Elaboración propia para la investigación titulada Validación del método oficial AOAC 986.33 para el recuento de *Escherichia coli* en leche humana, bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente

## Discusión de Resultados

En el primer inóculo se obtuvo una media de reproducibilidad de 0.24603, en el segundo inóculo una media reproducibilidad de 0.10650 y en el tercer inóculo una media de reproducibilidad de 0.07218.

Estos resultados cumplen con el criterio de aceptación que es menor a 3, lo cual indica que la variación entre una misma serie analítica es aceptable y contribuye a la precisión de la técnica analítica para determinar *E. coli* en leche humana. Se observa que esta variación es mayor a concentraciones menores.

En el primer inóculo se obtuvo una media de repetibilidad intermedia de 0.27667, en el segundo inóculo de 0.07738 y en el tercer inóculo de 0.04425.

Estos resultados de reproducibilidad son menores al criterio de aceptación que es 3 y por lo tanto puede considerarse como un método preciso, indicando que la técnica analítica puede ser ejecutada en leche humana por diferentes analistas bajo las mismas condiciones. También se observa que la precisión es mayor a concentraciones más altas de inóculo, sin embargo, se cumple el criterio de aceptación para el parámetro de precisión.

Con respecto a la incertidumbre se determinó una media de incertidumbre expandida de  $\pm 0.13250$ . Este valor de incertidumbre establece el intervalo asociado con un resultado de *E. coli* en leche humana, que expresa el intervalo de valores que razonablemente pueden atribuirse a la cantidad que se está midiendo.

Por otra parte, se calculó el porcentaje (%) de recuperación de cada inóculo analizado, mediante la adición de *E. coli* para tener tres inóculos en muestras de leche humana con las siguientes concentraciones teóricas de inóculos agregados a la

leche humana; 10 *UFC/mL*, 25 *UFC/mL* y 50 *UFC/mL*. En este estudio de validación, se obtuvo una media de porcentaje de recuperación de 94.46%, dicho resultado se encuentra dentro del rango aceptable para este parámetro, que es de 90 a 110%

Este resultado indica que la técnica analítica si es eficiente para detectar *E. coli* en leche humana, obteniendo porcentajes de recuperación más altos a concentraciones más altas de inóculo.

Comparado con el procedimiento por NMP, se observan las siguientes ventajas con la técnica analítica AOAC 986.33: a) menor cantidad de insumos utilizados, b) resultados cuantitativos cercanos a los que se tienen realmente, c) no hay interferencia por el color de la leche, d) se necesita menos volumen de leche humana considerando que son fracciones valiosas por el trabajo que representa su donación, recolección y manejo en los bancos de leche.

Para garantizar que los resultados sean precisos, reproducibles y confiables es esencial implementar un control de calidad. Entre los puntos críticos que deberían considerarse para el control de calidad en la validación de la técnica analítica AOAC 986.33 se pueden mencionar los siguientes:

- Hay que asegurar que las Placas Petrifilm 3M utilizadas sean específicas y selectivas para la identificación de *E. coli* de manera precisa.
- Calibración y mantenimiento regularmente del estado de pipetas y del equipo de laboratorio a utilizar (incubadora, campana de flujo laminar).
- Establecer un procedimiento estandarizado para la preparación de muestras de leche que incluya la inoculación y homogeneización.

- Hay que asegurar que los resultados reflejen con precisión la concentración de *E. coli* en la muestra.
- Utilización periódica de controles positivos que contengan una concentración conocida de *E. coli*, así como controles negativos (muestra de leche sin inocular) para verificar el funcionamiento adecuado del método.
- Realizar análisis repetidos con un analista de las mismas muestras de leche utilizando las Placas Petrifilm 3m en el mismo laboratorio bajo las mismas condiciones.
- Realizar análisis repetidos con diferentes analistas dentro del mismo laboratorio a realizar el análisis utilizando las Placas Petrifilm 3M.
- Documentación de todas las actividades relacionadas con los análisis incluyendo procedimientos, resultados y observaciones.

La implementación de estos puntos críticos y prácticas de calidad es esencial para garantizar que el método sea adecuado para su reproducibilidad a nivel intra laboratorios.

## Conclusiones

A partir del presente estudio se puede concluir lo siguiente:

- El proceso de validación de la técnica analítica oficial AOAC 986.33 para la determinación de *E. coli* en productos lácteos arrojó resultados satisfactorios. Se demostró que este método es adecuado y confiable para el recuento de *E. coli* en muestras de leche humana bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente.
- Los resultados obtenidos de la validación de la técnica analítica AOAC 986.33 (reproducibilidad 0.24603, 0.10650 y 0.07218, repetibilidad 0.27667, 0.07738 y 0.04425, porcentaje de recuperación 94.46% e incertidumbre  $\pm 0.13250$ ) indican que el método puede ser empleado en leche humana, obteniendo resultados confiables.
- Se sentaron las bases para llevar a cabo la validación de la técnica analítica oficial AOAC 986.33 a nivel inter laboratorios. Esto significa que otros laboratorios, tanto dentro como fuera del Hospital Regional de Occidente, pueden implementar esta metodología con confianza y obtener resultados coherentes. Esto facilita la colaboración y la comparación de resultados entre diferentes instituciones.
- Se emitieron recomendaciones basadas en la evaluación de beneficios y dificultades encontradas durante el proceso de validación. Estas recomendaciones están diseñadas para guiar a otros laboratorios que deseen adoptar el método AOAC 986.33, ayudándoles a superar posibles obstáculos y maximizando los beneficios de su implementación.



En resumen, los resultados satisfactorios de este estudio de validación respaldan una de las hipótesis planteadas que nos dice que el método oficial AOAC 986.33 es adecuado para la determinación de *E. coli* en muestras de leche humana bajo las condiciones del Laboratorio del Hospital Regional de Occidente. Este logro no solo garantiza la calidad y seguridad de la leche humana para los recién nacidos atendidos en este hospital, sino que también sienta las bases para una implementación más amplia de esta metodología en otros laboratorios, contribuyendo así a la mejora de los estándares de atención neonatal y la seguridad alimentaria en el país.

## Recomendaciones

A partir del presente estudio se emiten las siguientes recomendaciones:

- Realizar una validación inter laboratorio para realizar una validación completa.
- Implementar la técnica analítica AOAC 986.33 para la determinación de *E. coli* en leche humana en los Bancos de Leche del país, incluyendo al Banco de Leche del Hospital Regional de Occidente. Esta técnica tiene otras ventajas en comparación con la de NMP incluyendo: ya es una metodología con una validación intermedia, se disminuye la cantidad de material a preparar y manipular, por lo, reducción de costos y tiempo de trabajo, no interfiere el color de la leche como sucede con el NMP que lee turbidez y esta puede verse interferida por la coloración blanca de la leche.
- La exitosa validación previa sugiere que el método podría ser igualmente efectivo para la detección de coliformes totales. No obstante, se sugiere llevar a cabo estudios adicionales específicos para confirmar la aplicabilidad y precisión de este método en la determinación de coliformes totales,
- Publicar y socializar los resultados de validación de la técnica analítica AOAC 986.33 para la cuantificación de *E. coli* en leche humana.

## Referencias bibliográficas

3M petrifilm, Placas de recuento EC. (10 de 06 de 2023).

[https://www.3m.com.gt/3M/es\\_GT/p/d/v000207861/](https://www.3m.com.gt/3M/es_GT/p/d/v000207861/)

AGN. (20 de 11 de 2022). *Agencia Guatemalteca de Noticias*. <https://agn.gt/bancos-de-leche-humana-beneficiaron-a-mas-de-11-mil-recien-nacidos-en-2021/>

Alonso, Priveda. (2008). *Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas petrifilm 3M para el análisis de alimentos*.

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8238/tesis230.pdf?sequence=1>

AOAC international. (25 de 08 de 2023). (2019). *Métodos Oficiales de Análisis de AOAC INTERNATIONAL, conjunto de tres volúmenes, 21 edición*.

<https://multimedia.3m.com/mws/media/1759922O/aoac-oma-986-33-bacterial-and-coliform-count-in-milk.pdf>

AOAC INTERNATIONAL. (15 de 01 de 2023). *Scribd*.

<https://es.scribd.com/document/402316522/AOAC-docx>

ATCC2023. (2023). *Escherichia coli 25922 Product Sheet*.

[file:///C:/Users/Eugenio/Desktop/Nueva%20carpeta/25922%20Product%20Sheet%20-%20Escherichia%20coli%20\(Migula\)%20Castellani%20and%20Chalmers.pdf](file:///C:/Users/Eugenio/Desktop/Nueva%20carpeta/25922%20Product%20Sheet%20-%20Escherichia%20coli%20(Migula)%20Castellani%20and%20Chalmers.pdf)

- Camaró Sala, M. L., Catalá Cuenca, V., Gardona, G. C., Martínez Garcia, R., y Olmos Martínez, P. (2013). *Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos*.  
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia48.pdf>
- Cordero et al. (2005). *Lactancia Materna*. Tercera edición.
- F. U. (2019). *Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds*. 3.0.
- Feldsine et al. (2002). REVISTA AOAC INTERNACIONAL. *Directrices del Comité de Métodos de la AOAC INTERNACIONAL para la Validación Cualitativa y Cuantitativa de Alimentos Métodos Oficiales de Análisis Microbiológicos*, 85(5).
- Feng et al., P. (2022). *Manual de análisis bacteriológico, capítulo 4, Enumeración de Escherichia coli y las bacterias coliformes*.
- Feng, P., D. Weagant, S., Grant, M., & Burkhardt, W. (2020). Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. En *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*.
- Flores. (2018). *Determinación de bacterias mediante la prueba de control microbiológico de la leche materna en mujeres que acuden a donar al banco de leche*.
- García Lopez, E. (2013). *Implementación de un método de conservación de sepsas bacterianas*. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MEXICO. Retrieved 04 de 07 de 2023, from [https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis\\_garcia\\_lopez.pdf](https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_garcia_lopez.pdf)
- García, R. (2011). *Composición e inmunología de la leche humana*.

González et al, R. (2020). *Microbiota de la leche humana y su impacto en la salud humana.*

Mexico: Parmanyer.

Gormaz et al . (2011). *Activity of a breast milk bank in a Neonatal Unit.*

Guía Eurachem. (2016). *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados.*

ISO. (26 de 07 de 2023). *Plataforma de navegación ISO 9000:2015(es)* .

<https://www.iso.org/obp/ui/es/#iso:std:iso:9000:ed-4:v1:es>

Magmusson, B., & Ornemark, U. (2014). *Gu.a Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados.*

[https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf)

Montero et al. (2020). *Health technology assessment, cost and equity impact analysis.*

MSPAS, & PROSAN. (2012). *Normas Técnicas para el Funcionamiento de los Bancos de Leche Humana.*

OGA - Oficina de Acreditación Guatemalteca, C.A. (2023). *Política de la Selección y*

*Validación de Métodos de Ensayo.* [https://oga.org.gt/wp-](https://oga.org.gt/wp-content/uploads/2021/04/OGA-GEC-016politica_seleccion_y_valid_metodos.pdf)

[content/uploads/2021/04/OGA-GEC-016politica\\_seleccion\\_y\\_valid\\_metodos.pdf](https://oga.org.gt/wp-content/uploads/2021/04/OGA-GEC-016politica_seleccion_y_valid_metodos.pdf)

OMS. (2018). *E.Coli.* E. Coli: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli#:~:text=Escherichia%20coli%20(E.,pueden%20causar%20graves%20intoxicaciones%20alimentarias.)

[coli#:~:text=Escherichia%20coli%20\(E.,pueden%20causar%20graves%20intoxicaciones%20alimentarias.](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli#:~:text=Escherichia%20coli%20(E.,pueden%20causar%20graves%20intoxicaciones%20alimentarias.)

Osorio, L. M., & Umbarilla, A. S. (2015). *Microbiota de la glándula mamaria.*

Salazar et al. (2009). *Lactancia materna*. Immunology of Breastmilk:

[www.hpakids.org/holistic-health/articles/11/1/Immunology-of-Breastmilk](http://www.hpakids.org/holistic-health/articles/11/1/Immunology-of-Breastmilk).

Salfinger, Y., & Tortorello, M. L. (2015). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of food*. Fifth edition.

Sandle, T. (2015). Approaching Microbiological Method Validation.

Scarlet Salazar, M. C. (diciembre de 2009). *Scielo*. Lactancia Materna:

[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06492009000400010](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06492009000400010)

TCM . (2020 de 01 de 9). *TCM*. <https://www.tcmetrologia.com/blog/que-son-las-cepas-atcc/>

Torre, M. J. (2010). *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de gastroenterología, hepatología y nutrición pedriatica SEGHP-AEP*. ERGON.

Wallace A. . (s.f.). *Microbiological Methods. AOAC Official Method of Analisis. Supplement March 1996. Bacterial and*.

## Anexo 1

### Guía de interpretación de Placas Petrifilm para el Recuento de *E. coli*/coliformes

**3M** Guía de interpretación

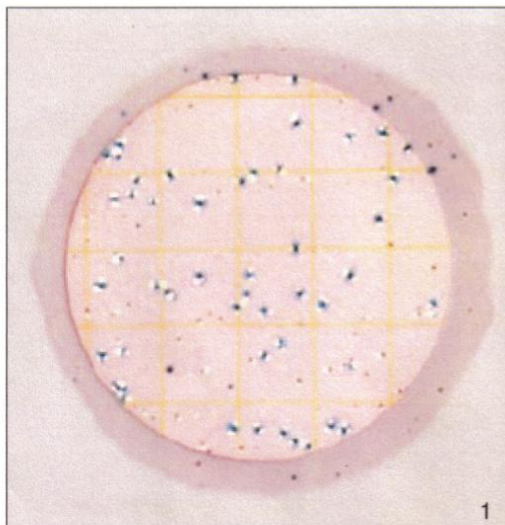
# Placas Petrifilm™

## para el Recuento de *E. coli*/Coliformes

Esta guía lo familiarizará con los resultados de las Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes. Para mayor información, contacte al representante autorizado de productos de 3M Microbiología más cercano.

Las Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes (Placa Petrifilm EC) contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias. La mayoría de las *E. coli* (cerca del 97%) produce beta-glucuronidasa, la que a su vez produce una precipitación azul asociada con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por *E. coli* y coliformes fermentadores de lactosa. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, representado por colonias entre azules y rojo-azules asociadas con el gas atrapado en la Placa Petrifilm EC (dentro del diámetro aproximado de una colonia).

La AOAC Internacional y el Manual de Análisis Bacteriológico de la FDA de los Estados Unidos definen los coliformes como colonias de bastoncillos gram-negativos que producen ácido y gas de la lactosa durante la fermentación metabólica de la lactosa. Las colonias coliformes que crecen en la Placa Petrifilm EC, producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de coliformes confirma su presencia.

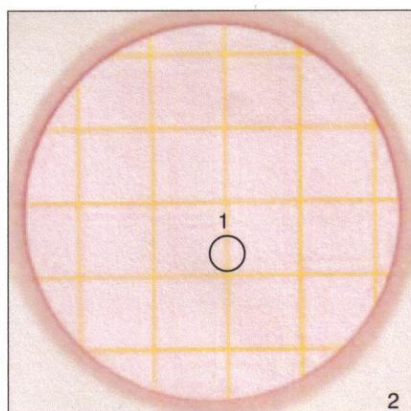


La identificación de la *E. coli* puede variar de país a país (ver en "Recomendaciones de uso" tiempos de incubación y temperaturas).

Método validado por la AOAC Internacional  
*E. coli* = 49 (colonias azules con gas)  
 Total coliformes = 87 (colonias rojas y azules con gas)

(NO use esta placa sola para la detección de *E. coli* O157. Como la mayoría de otros medios para enumeración de *E. coli* coliformes, esta placa no señalará específicamente si está presente algún O157).

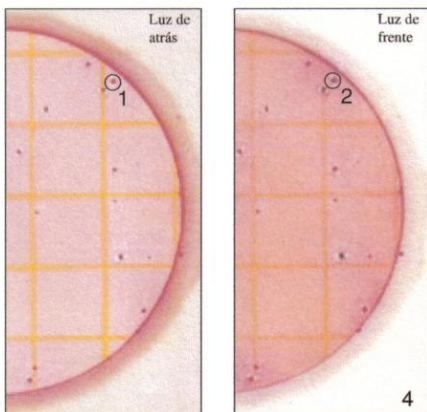
## 3M™ Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli* / Coliformes



### No crecimiento = 0

Observe el cambio de color del gel de las figuras 2 a 8. Mientras el recuento de *E. coli* o coliformes aumenta, el color del gel se vuelve rojo oscuro o púrpura azulado.

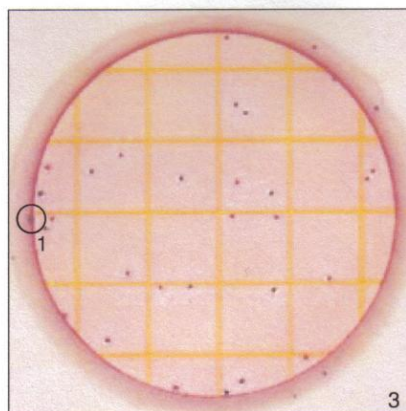
Las burbujas del fondo son características del gel y no son el resultado del crecimiento de *E. coli* o coliformes. Ver el círculo 1.



### Recuento de *E. coli* = 3

Cualquier azul en una colonia (de azul a rojo-azul) indica la presencia de *E. coli*. La luz de frente mejorará la detección del precipitado azul formado por una colonia.

El círculo 1 muestra una colonia rojo-azul cuyo conteo se hizo con luz de atrás. El círculo 2 muestra la misma colonia con luz de frente. El azul precipitado es más evidente en el círculo 2.

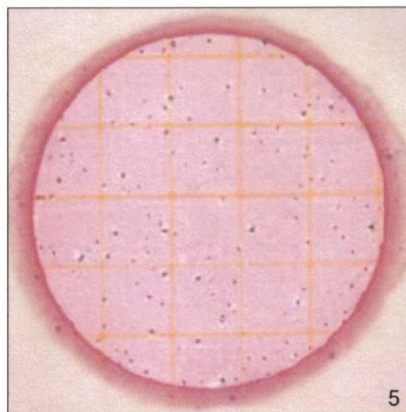


### Recuento de *E. coli* = 13

### Total de recuento de coliformes = 28

El rango de recuento de la población en las Placas Petrifilm EC es de 15 a 150.

No cuente las colonias que aparecen sobre la barrera de espuma, ya que han sido removidas de la influencia del medio selectivo. Ver el círculo 1.



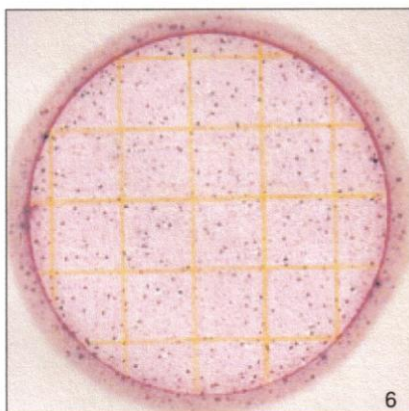
### Recuento de *E. coli* = 17

### Recuento total estimado de coliformes = 150

El área circular de crecimiento es de aproximadamente 20 cm<sup>2</sup>. El recuento estimado se puede hacer en las placas que contienen más de 150 colonias, al contar el número de colonias en uno o más de los cuadrados representativos y al determinar el promedio por cuadrado. Multiplique el número promedio por 20 y determine el conteo estimado por placa.

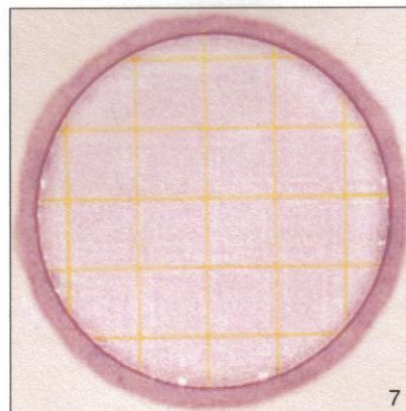


**MNPC** (Muy Numerosas Para Contar): para obtener un recuento más preciso, diluya más la muestra



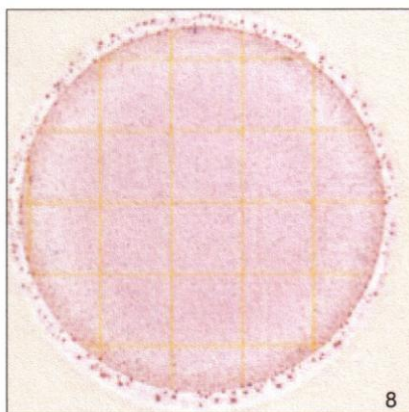
**Recuento actual aprox.  $\sim 10^6$**

Las Placas Petrifilm EC con colonias que son MNPC, tienen una o más de las siguientes características: Muchas colonias pequeñas, muchas burbujas de gas y el oscurecimiento del gel de un color rojo a un azul púrpura.



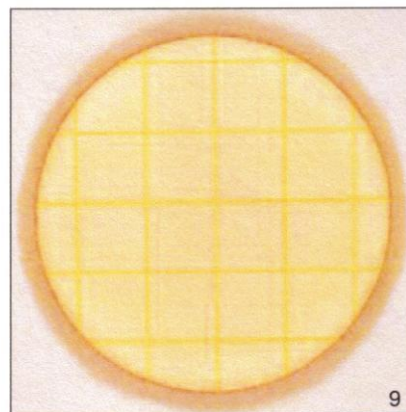
**Recuento actual aprox.  $\sim 10^8$**

Una alta concentración de *E. coli* puede causar que el área de crecimiento se haga azul púrpura.



**Recuento presuntivo de *E. coli*  $\sim 8$**

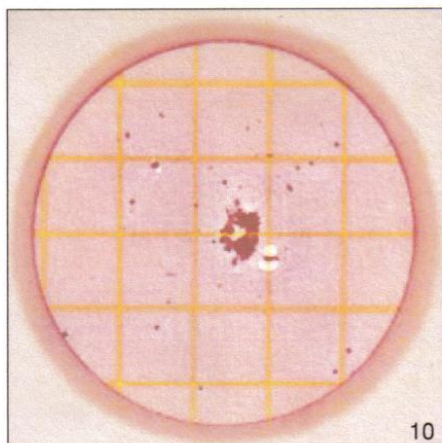
**Recuento total estimado de coliformes aprox.  $\sim 10^8$**   
 Cuando existen cifras altas de coliformes ( $10^8$ ), algunos tipos de *E. coli* presuntiva pueden producir menos gas y las colonias azules pueden ser menos definitivas. Cuente todas las colonias azules sin gas y/o zonas azules como *E. coli*. Si es necesaria la confirmación, aisle las colonias azules con gas para su posterior identificación.



**Recuento actual aprox. de  $\sim 10^8$**

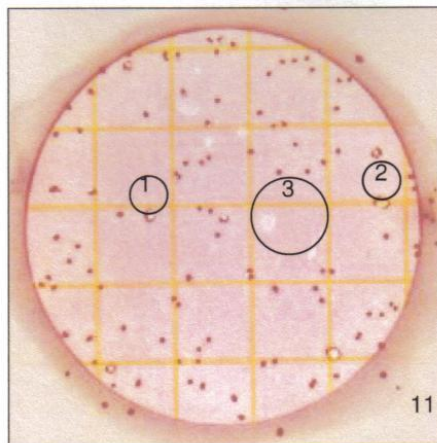
Cuando un número alto de organismos no-coliformes, como las *Pseudomonas*, estén presentes en las Placas Petrifilm EC, el gel puede volverse amarillo.

## Burbujas



**Recuento total de coliformes = 3**

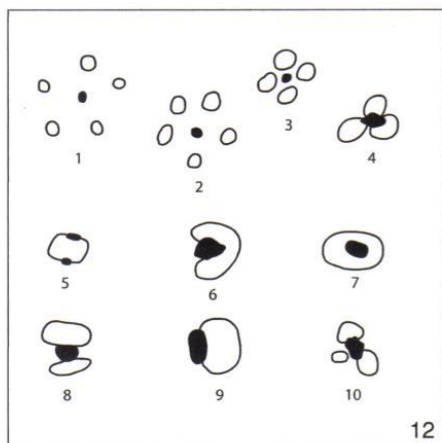
Las partículas de alimento tienen forma irregular y no tienen burbujas de gas.



**Recuento total de coliformes = 78**

Los patrones de burbujas pueden variar. El gas puede romper la colonia y así, esta última 'delinea' a la burbuja. Vea los círculos 1 y 2.

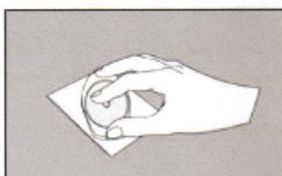
Las burbujas pueden aparecer como resultado de una inoculación impropia o de aire atrapado dentro de la muestra. Tienen forma irregular y no se asocian con una colonia. Vea el círculo 3.



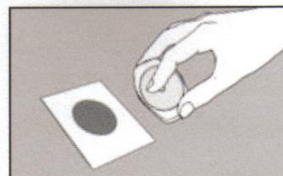
Los ejemplos 1 a 10 muestran varios patrones de burbujas asociados con colonias que producen gas. Todas deben ser enumeradas.



**10** Con el lado **liso** hacia abajo, coloque el dispersor en la película superior sobre el inóculo.

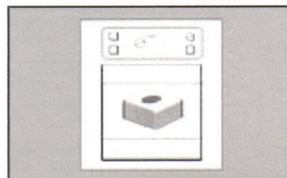


**11** Presione **suavemente** el dispersor para distribuir el inóculo sobre el área circular. No gire Ni deslice el dispersor.



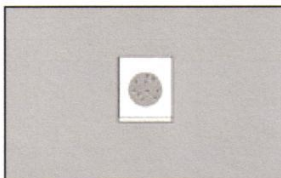
**12** Levante el dispersor. Espere, por lo menos un minuto, a que solidifique el gel.

### Incubación

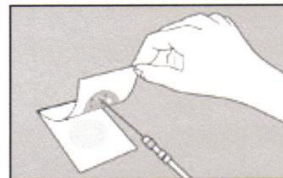


**13** Incube las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

### Interpretación



**14** Las Placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz. Consulte la Guía de Interpretación para leer los resultados.



**15** Las colonias pueden ser aisladas para su posterior identificación. Levante la película superior y tome la colonia del gel.

El tiempo de incubación y la temperatura varían según el método.

Los métodos aprobados más conocidos son:

• **AOAC método oficial 991.14**

Para coliformes:  
Incubar 24 h  $\pm$  2 h a 35 °C  $\pm$  1 °C.  
Para *E. coli*:  
Incubar 48 h  $\pm$  2 h a 35 °C  $\pm$  1 °C.

• **AOAC método oficial 998.08**

Para *E. coli* (carnes, aves, marinos):  
Incubar 24 h  $\pm$  2 h a 35 °C  $\pm$  1 °C.

• **Método NMKL (147.1993)**

Para coliformes:  
Incubar 24 h  $\pm$  2 h a 37 °C  $\pm$  1 °C.  
Para *E. coli*:  
Incubar 48 h  $\pm$  2 h a 37 °C  $\pm$  1 °C.

### Comentarios adicionales

- Nota: Recuerde inocular y poner el aplicador antes de pasar a la siguiente placa.
- Para contactar localmente a 3M Microbiología en Latinoamérica, visítenos en nuestra página de internet: [www.3M.com/microbiology](http://www.3M.com/microbiology)
- Para servicio técnico en Latinoamérica, contacte la dirección [serviciotecnomico@mmm.com](mailto:serviciotecnomico@mmm.com) o llame al 5255-5270-2223.

**3M**

**3M Microbiology**  
3M Center, Bldg. 275-5W-05  
St. Paul, MN 55144-1000  
USA  
1800-228-3957  
[microbiology@mmm.com](mailto:microbiology@mmm.com)  
[www.3M.com/microbiology](http://www.3M.com/microbiology)

**3M México**  
Av. Santa Fe 190  
Col. Santa Fe, C.P. 01210  
México, D.F.  
Tel. (55-52) 5270-0454  
01 800-712-2527  
[microbiologiamx@mmm.com](mailto:microbiologiamx@mmm.com)

**3M Argentina**  
Olga Cossetini 1031  
Buenos Aires,  
CP C1107CEA  
Argentina  
Tel. (54-11) 4339-2400  
[microbiologia-ar@mmm.com](mailto:microbiologia-ar@mmm.com)

Petrifilm es una marca registrada de 3M.  
Impreso en México.  
Revisión: 2006-01  
Referencia: 70-2008-8105-3.

Quetzaltenango, 2 de noviembre de 2021

Estimado:

Dr. Elie de León  
Comité de Docencia e Investigación  
Hospital Regional de Occidente  
Asunto: Autorización Trabajo de tesis.

Respetuosamente nos dirigimos a ustedes con el fin de solicitar su autorización para la realización del estudio de investigación denominado "VALIDACION DEL METODO OFICIAL AOAC 986.33 PARA EL RECUESTO DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN LECHE HUMANA, BAJO LAS CONDICIONES DEL LABORATORIO DE BANCO DE LECHE DEL HOSPITAL REGIONAL DE OCCIDENTE" Para optar al título de Química Biológica en la universidad galileo.

El tiempo del estudio para la fase experimental será durante el mes de enero del presente año, a través de la aplicación del método AOAC 986.33 en placas Petrifilm 3M. La investigación permitirá establecer evidencia de la exactitud y confiabilidad que tiene el BLH para realizar dichos análisis.

El trabajo de investigación estará orientado por la Licda. Paola Juárez Jefa del Laboratorio HRO.

La propuesta de investigación ya tiene una aprobación institucional, por parte de la Universidad Galileo, es importante aclarar que el desarrollo de la presente investigación no implica ningún tipo de riesgo para el laboratorio de Banco de Leche. Asegurando que el único fin es el de generar conocimiento científico útil a nivel nacional.

Los compromisos serán:

Manejar completamente confidencialidad frente a la información recopilada, pues será manipulada solo con fines netamente científicos, adoptar las medidas de bioseguridad necesarias y seguir con el cronograma de la ejecución según corresponde.

Además una vez terminada la investigación, se hará entrega al Laboratorio de Banco de Leche los resultados del mismo.

Su aprobación para realizar este estudio será muy apreciada. De antemano agradecemos su amable atención y colaboración.

Atentamente,

ASTRID DAYANARA SAMAYOA ORDOÑEZ  
SERGIO DANILO HERNANDEZ DE LEON  
Carnet: 14008321  
Carnet: 13003984  
Estudiantes de Química Biológica  
Universidad Galileo  
e-mail. Samayoaastrid1@gmail.com  
Sergiohernandez2019@gmail.com  
Celular: 59491701  
42393202

Sergio Hernández

Astrid Samayoa

Licda. Paola B. Juárez S.  
Química Bióloga  
Colegiada No. 3488

Vo.Bo.   
D. Juan Sánchez  
del Bco. Banco de Leche Humano.



GOBIERNO de  
GUATEMALA

MINISTERIO DE  
SALUD PÚBLICA Y  
ASISTENCIA SOCIAL  
HOSPITAL REGIONAL  
DE OCCIDENTE,  
QUETZALTENANGO

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social  
HOSPITAL REGIONAL DE OCCIDENTE  
*Comité De Docencia e Investigación*

Quetzaltenango 13 de enero de 2022

Bachilleres:

**ASTRID DAYANARA SAMAYOA ORDOÑEZ**  
**SERGIO DANILO HERNÁNDEZ DE LEÓN**

Ciudad:

En relación a su solicitud para realizar el trabajo de tesis titulado **"VALIDACIÓN DEL MÉTODO OFICIAL AOAC 986.33 PARA EL RECuento DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN LECHE HUMANA, BAJO LAS CONDICIONES DEL LABORATORIO DE BANCO DE LECHE"**. Estudio a realizarse en el Banco de Leche Humana. En representación del Comité de Docencia e Investigación se aprueba el anteproyecto de Investigación, debiendo presentar el protocolo respectivo para su revisión y aprobación.

Sin otro particular me suscribo de usted, atentamente.

*Por El Comité De Docencia E Investigación"*

*Elie A. de León N.*  
NEUROLOGO PEDIATRA  
C.O.L. No. 10435

Dr. Elie Alberto de León Natareno  
Coordinador Comité de Docencia e Investigación  
Hospital Regional de Occidente

