



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

**“Revalidación del método de determinación de aerobios
mesófilos para el control de calidad de polvo de cacao
alcalino en una empresa de semielaborados de cacao”**

PROYECTO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del Título de:

**MAGÍSTER EN GESTIÓN DE PROCESOS Y SEGURIDAD DE
LOS ALIMENTOS**

Presentada por:

Janine Ordoñez Pazmiño

GUAYAQUIL-ECUADOR

Año:2022

AGRADECIMIENTO

A Dios, al apoyo incondicional de mi familia, a mi directora de proyecto, MSc. Leyla Solórzano, a los directivos de la compañía por la confianza depositada en mí, a quienes colaboraron para la realización del presente trabajo y acompañaron en esta grata travesía de concretar mis estudios de maestría.

DEDICATORIA

Este trabajo realizado con esfuerzo por varios meses está dedicado a mis hijas Hillary, Olga y Josy, que son el motor de mi vida; a mi esposo Fernando, por su apoyo incondicional y leal en confiar en mis aspiraciones profesionales, a mi ejemplar y luchadora madre, a mi padre, quien con su luz siempre me guía y me acompaña; a mis fraternales hermanos, a mis maestros de quienes admiro su devoción por la enseñanza e inspiran amar la profesión que me ampara.

TRIBUNAL DE TITULACIÓN

Leyla Solórzano M.,MSc
DIRECTORA DEL PROYECTO

Patricio Cáceres, PHD.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este proyecto de titulación, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

Janine Ordoñez Pazmiño

RESUMEN

El presente proyecto consistió en la validación del método analítico de recuento de aerobios mesófilos para polvo de cacao alcalino de una empresa de semielaborados de cacao con el propósito de generar resultados fidedignos que se enviaran al laboratorio.

La confirmación de los métodos se usa para estimar la fiabilidad, calidad y la constancia de los resultados de análisis.

La metodología aplicada en la presente literatura consideró: diagnóstico inicial, la implementación del método estandarizado y la verificación de los resultados a través de pruebas de Inter comparación.

En el diagnóstico inicial se realizó la verificación de las actividades de pre-validación las cuales fueron: recopilación de la información relacionada con el proceso, evaluación de infraestructura de laboratorio, requisitos de suministros de referencia, capacitación al personal, revisión de los procedimientos para las operaciones, incumplimientos en las actividades, para las cuales se implementaron las respectivas acciones de mejoras.

De los resultados obtenidos de la validación se implementaron el método estandarizado, y se procede a participar en las pruebas Inter laboratorios convocadas por un laboratorio acreditado para la verificación de la confiabilidad de los resultados analíticos del recuento de placas de aerobios mesófilos, emitidos por laboratorio de Control de Calidad.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	<i>i</i>
CAPÍTULO 1	1
1.INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2	3
2. ESTADO DE LA SITUACIÓN ACTUAL.....	3
2.1 Descripción del producto.....	3
2.2 Descripción del problema	3
2.2.1 Reclamaciones	4
2.3 Justificación de la investigación	4
2.4 Objetivo del estudio.....	4
2.4.1 Objetivo General.....	4
2.4.2 Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO 3	5
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1 Control de Calidad e inocuidad de los alimentos	5
3.2 Garantía de Calidad.....	5
3.2.1 Gestión de Infraestructura.....	6
3.2.1.1 Condiciones ambientales	6
3.2.1.2 Personal.....	7
3.2.2 Equipos.....	7
3.2.3 Procedimiento de Trabajo	7
3.2.4 Validación.....	8
3.3 Aseguramiento de la calidad	9
CAPÍTULO 4	11
4.METODOLOGÍA.....	11
4.1 Metodología para revalidación del método.....	11
4.1.1 Diagnóstico inicial	11
4.2 Implementación del método estandarizado	12
4.2.1 Esquema (Árbol de decisión)	12
4.2.2 Diseño experimental	14
4.2.2.1 Selectividad/ Especificidad	14
4.2.2.2 Límite de detección	15
4.2.2.3 Límite de cuantificación.....	15
4.2.2.4 La exactitud.....	15

4.2.2.5 La recuperación	16
4.2.2.6 Repetibilidad.....	16
4.2.2.7 Precisión Intermedia	17
4.2.2.8 Reproducibilidad	17
4.2.2.9 Intervalo de trabajo.....	17
4.2.2.10 Robustez	18
4.2.2.11 Reproducibilidad	18
4.2.2.12 Declaración de método validado. Registros	18
4.2.2.13 Control del método. Revalidación	19
4.3.1 Metodología:	19
CAPÍTULO 5.....	22
5. RESULTADOS OBTENIDOS.....	22
5.1 ACTIVIDADES EJECUTADAS	22
5.1.1 Diagnóstico Inicial	22
5.1.1.3 Adquisición de materiales de referencia.....	23
5.1.1.4 Adquisición de equipos.....	23
5.1.1.5 Calibración de Equipos	23
5.1.2 Implementación del método estandarizado	23
5.1.3 Verificación del método	23
5.1.4 Declaración del método validado.....	27
5.2 Análisis de prueba de competencia.....	27
5.2.1 Informe de prueba de desempeño	28
CAPÍTULO 6.....	31
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	31
6.1 Conclusiones.....	31
6.2 Recomendaciones	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Programa de garantía de la calidad.....	6
Figura 2 Flujo de Trabajo en un laboratorio de microbiología.....	7
Figura 3 Validación de métodos.....	8
Figura 4 Requisitos del método AOAC 990.12.....	11
Figura 5 Requisito de Infraestructura de acuerdo con la normativa 17025.....	12
Figura 6 Validación del método.....	14
Figura 7 Resumen de la metodología.....	19
Figura 8 Analito Total aerobic mesophilic count.....	28
Figura 9 Resultados de lecturas de recuentos de aerobios mesofilos.....	28
Figura 10 Resumen de competencia.....	28
Figura 11 Valores asignados a la muestra de referencia 713 chocolate.....	29
Figura 12 Puntuaciones z score range.....	29
Figura 13 Gráfico de distribución.....	30

CAPÍTULO 1

1.INTRODUCCIÓN

En la actualidad los consumidores de productos alimenticios exigen que estos sean elaborados de forma inocua y se cumplan con determinadas normas, para esto es necesario contar con técnicas adecuadas que permitan determinar las especies y grupos de microorganismos presentes en los productos alimenticios.

La característica microbiológica de un alimento es importante porque de esta depende su preservación y propósito como producto, y así, para garantizar que este posee calidad y es apto para los alimentos se desarrollan técnicas microbiológicas de controles preventivos (Flavia et al., n.d.)

La detección de microorganismos en los alimentos a nivel de laboratorio es fundamental. Existen normativas de buenas prácticas microbiológicas que previenen el riesgo de contaminación y normas de requisitos de elaboración de productos que determinan el nivel de aceptación de los microorganismos patógenos por microorganismo, estas normativas se basan en microorganismos indicadores que detectan un manejo inadecuado en higiene durante el proceso, una contaminación que puede disminuir la finalidad del producto, o que puede aumentar la amenaza de microorganismos nocivos.(Flavia et al., n.d.)

Estos microorganismos proporcionan una guía del estado de conducción o de validez del proceso, así se incluyen: Mesófilos aerobios (o cuenta total), hongos y levaduras, Coliformes totales.

De la clasificación de los microorganismos, estos se agrupan en:

- Grupo 1 microorganismos sin peligro para el hombre, sin embargo, los riesgos influyen en el tiempo de utilidad del producto(Flavia et al., n.d.)
- Grupo 2 microorganismo de riesgo indirecto bajo (Flavia et al., n.d.)
- Grupo 3 microorganismos de riesgos alto para la salud (Flavia et al., n.d.)

Según Flavia et al, las técnicas microbiológicas permiten evaluar:

- Los atributos de la materia original, las dificultades para su conservación, indiscriminado uso de temperatura, vida útil (recuento de aerobios mesófilos)
- Elevado porcentaje de nocivos fecales o eventuales registros de patógenos, como: Escherichia coli, Coliformes fecales, etc
- Equívoco manipuleo humano, pudiéndose contraer: Staphylococcus aureus coagulasa positiva
- Ausencia de protocolo posterior a tratamiento térmico, originándose: coliformes, enterobacterias, Staphylococcus aureus coagulasa positiva, estreptococos fecales
- Presencia de componentes metabólicos perjudiciales a la salud

MESÓFILOS AEROBIOS O RECuento TOTAL

A esta clasificación se agrupan todos los microorganismos con capacidad de desarrollo en presencia de oxígeno, a temperaturas medias y altas: de 20 °C y 45 °C con una óptima entre 30 °C y 40 °C.

La cuenta total de microorganismos aerobios mesófilos considera que la microflora total no específica los tipos de microorganismos.(Analítica Oficial, 2014)

Estos recuentos indican la calidad sanitaria de cómo se ha elaborado este alimento. El conteo bajo de aerobios mesófilos advierte que la presencia de microorganismos nocivos ni sus venenos, ni los recuentos elevados no nos indica presencia de patógenos.(Flavia et al., n.d.)

Los recuentos elevados de aerobios pueden ser:

- Excesiva contaminación de la materia prima (Flavia et al., n.d.)
- Deficiente manipulación durante el proceso de elaboración(Flavia et al., n.d.)
- La posibilidad de que existan patógenos, pues estos son mesófilos(Flavia et al., n.d.)
- La inmediata alteración del producto (Flavia et al., n.d.)

En resumen, el estudio de cálculo de microorganismos aerobios mesófilos es de gran importancia, porque la presencia de estos puede deteriorar el producto si no se considera el protocolo para su conservación, dejando como resultado acortar y preservar su vida útil y mitigar los reclamos de los clientes.

CAPÍTULO 2

2. ESTADO DE LA SITUACIÓN ACTUAL

2.1 Descripción del producto

El polvo de cacao alcalino es un polvo soluble de consistencia autónoma, originaria de la torta de cacao alcalina molida extraída a través del proceso de prensado de la pasta de cacao alcalina. El producto es construido desde las semillas de cacao (*Theobroma cacao*, family Malvaceae Linnaeus).

El cacao en polvo está sujeto a una serie de requisitos microbiológicos de aerobios mesófilos establecido en la tabla 1, que se encuentra en la NORMA TÉCNICA ECUATORIANA -INEN 620 "Cacao en polvo requisitos".

Tabla 1

Requisitos microbiológicos del polvo de cacao

REQUISITO	UNIDAD	n	m	C	M	Método de ensayo
Aerobios Mesófilos	UFC/g	5	10 ³	2	10 ⁴	AOAC 990.12

Fuente: Norma técnica -INEN 620

n es considerado el número de ejemplares a analizar;

m es determinar la limitante de aprobación;

M es consecuente al límite superado que se excluye;

c es la cantidad de muestras aceptada con efectos de los resultados de m y M

2.2 Descripción del problema

Al llevar a cabo el estudio el origen sobre reclamos de los clientes por recuentos de aerobios mesófilos elevados, se evidenció una falta de consistencia entre los resultados de los análisis internos y los realizados por los clientes.

Tabla 2

Lecturas comparativas de Laboratorio de clientes VS Lectura de laboratorio interno

Lecturas de laboratorio de clientes	Lectura de laboratorio interno
6220 UFC/g	2100 UFC/g
7200 UFC/g	3200 UFC/g
14000UFC/g	4200 UFC/g
20000 UFC/g	4000 UFC/g
2600 UFC/g	1250 UFC/g

Fuente: Laboratorio de semielaborados de cacao

Como se observa en la tabla 2, existe una alta dispersión de los resultados comparativos entre los laboratorios de los clientes y el laboratorio interno, los cuales representan devolución del producto y con ello grandes pérdidas económicas. Esto conlleva que la empresa requiera tomar acciones de mejora, como establecer un riguroso programa de

control interno del laboratorio para alcanzar resultados altamente confiables del estudio de recuento de microorganismos aerobios mesófilos.

Con la implementación del programa de control interno del laboratorio que consiste en evaluación continua de los métodos analíticos que se realiza a través de la validación, con esto se obtendrá confiabilidad del producto y aprobación de este requisito de calidad establecido por los clientes.

2.2.1 Reclamaciones

La empresa en estudio cuenta con certificación FSSC 22000 y los objetivos del SGI planteados son:

Objetivo	Mantener 0 reclamaciones de inocuidad
Meta	0
Fórmula de cálculo	Sumatoria de reclamaciones por inocuidad

Tabla 3

Reclamaciones por inocuidad

	Enero	Feb	Mar	Abril	May	Jun	Jul	Agos	Sep	Oct	Nov	Dic	Sumatoria	Reclamos por Microbiología
2021	1		2	1						3		1	8	25 %
2022		1	1	1	1			1					5	80%

En la tabla 3, se observa cómo en el año 2021 se presentaron 25% de los reclamos por microbiología de recuentos de aerobios fuera de especificación por variabilidad en los resultados y, en el año 2022 se obtuvieron 80% de reclamaciones por lecturas de recuentos microbiológicos elevadas.

2.3 Justificación de la investigación

El presente trabajo se encamina a realizar un análisis de diagnóstico para hallar las causas que influyen en la inconsistencia de las lecturas de recuentos de aerobios mesófilos, se establecen las acciones de mejora y con esto se logra la confiabilidad del laboratorio.

2.4 Objetivo del estudio

2.4.1 Objetivo General

Establecer consistencia en los resultados del análisis de recuento de microorganismos aerobios mesófilos emitidos por el laboratorio de calidad.

2.4.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar y determinar el estado actual del laboratorio y de los métodos que se están manejando.
2. Estandarizar la técnica de análisis de recuento de microorganismos aerobios mesófilos.
3. Lograr confiabilidad de los resultados a través de pruebas intercomparación.

CAPÍTULO 3

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Control de Calidad e inocuidad de los alimentos

Para asegurar la inocuidad de los alimentos se crea el sistema HACCP que se origina en los años 70 en los programas especiales de la NASA, y luego de lo cual la mayoría de los países lo adoptaron.

La Organización Panamericana de la Salud (2021), sostiene que el sistema HACCP tiene su fundamento en siete principios tácitos para verificar y valorar peligros (biológicos, químicos, físicos), emplear y aprobar científicamente los estándares de control (puntos críticos de control, PCCs), supervisar los PCCs, ejecutar enmiendas sobre situaciones anómalas, todo esto logrado a través de programas de controles de calidad e inocuidad.

Para el año de 1992, FAO: Agricultura, manifestó que el objetivo del programa de control de calidad e inocuidad de los alimentos tiene su fundamento en precautelar el bienestar y las condiciones de salud de los consumidores, impulsar la comercialización de los alimentos, salvaguardar los beneficios de los productores o expendedores de víveres, forjados en ética profesional y competitividad.

3.2 Garantía de Calidad

Los objetivos de un laboratorio a gran escala son generar óptimos y fiables resultados, sostiene FAO: Agricultura (1992), a tal punto que, el laboratorio tradicional de control de los alimentos esté dotado de servicios químicos y microbiológicos.

La garantía de calidad es un conjunto de acciones que dan confiabilidad al proceso de control de calidad que tiene competentes consecuencias metódicas de aguda eficacia. Los laboratorios que apliquen una estructura de garantía de la calidad deben de actuar bajo un instructivo que profese al detalle sus operaciones de Buenas Prácticas de Laboratorio, ver *Figura 1*.

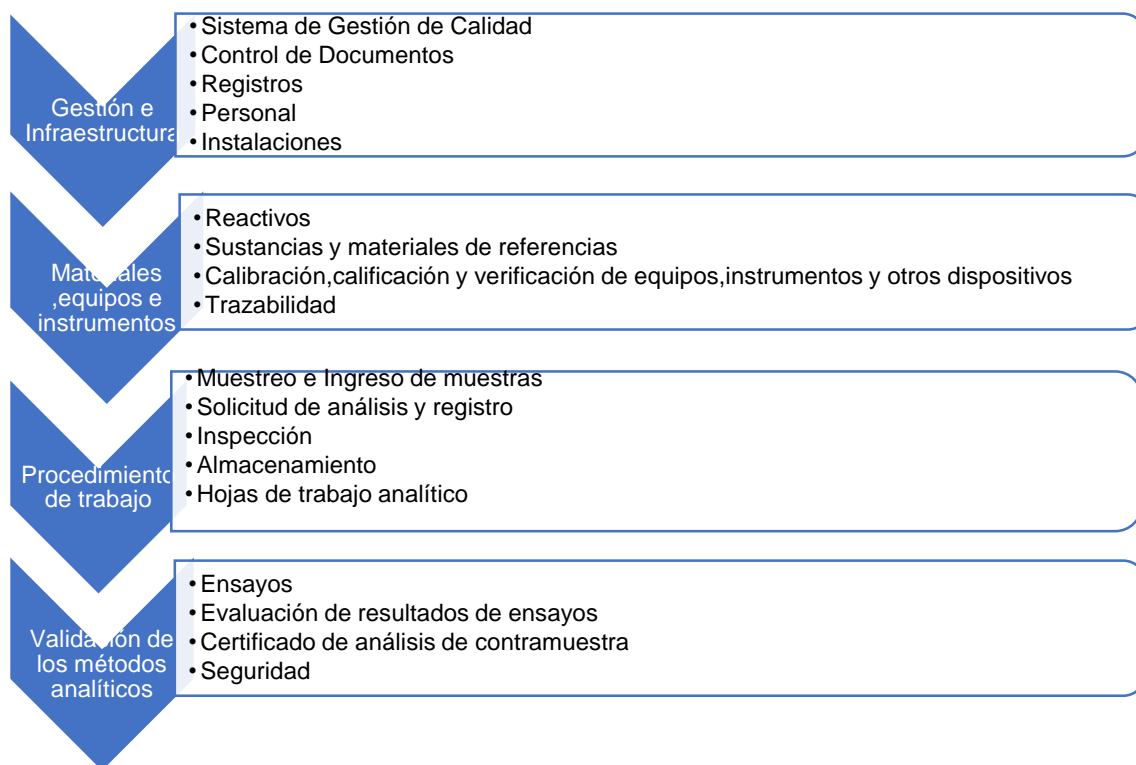


Figura 1 Programa de garantía de la calidad

Fuente: propia autoría

3.2.1 Gestión de Infraestructura

3.2.1.1 Condiciones ambientales

El laboratorio debe asegurarse que las condiciones ambientales, donde se realiza los análisis microbiológicos, no invaliden ni comprometan la calidad de los resultados.

Los requisitos técnicos necesarios para que las condiciones ambientales no afecten los resultados de los ensayos deben estar documentados

Según norma ISO 7218:2013 debe estar a una temperatura de 18 a 27 °C.

Limpieza y desinfección

1. Considerar periódicas limpiezas y desinfecciones, con el propósito de contar con una asepsia adecuada en todas las instalaciones que serán lugares seleccionados para realizar los ensayos. Las áreas corrompidas o altamente contaminadas deben desinfectarse con líquidos bactericidas y fungicidas.
2. Verificar los sistemas de ventilación y sus filtros, su mantenimiento debe ser constante y periódico, asegurando que los canales de aire mantengan los filtros sin obstrucción o proliferen aire de baja calidad.
3. La eficacia microbiológica de las superficies permite optimizar que las superficies y el aire sean vigilados con frecuencia que cumplan con los estándares para efectos de ensayos previos.
4. Procedimiento de monitoreo ambiental, mediante la recepción de una muestra de los lugares, se puede establecer los términos de tolerancia o los rangos descriptivos de aprobación o rechazo, así como la periodicidad del monitoreo y las acciones correctivas a considerar ante algún extralímite.

3.2.1.2 Personal

Competencia

Para una eficaz evaluación de la competitividad, se requiere plantear criterios objetivos que permita validar el proceso: pipeteo, homogeneidad deficiente de la suspensión inicial, recuento, etc.

Verificación

Para llevar a cabo una certera verificación del personal sobre sus aptitudes, facultades o experticia al verificar y evaluar con regularidad los parámetros objeto de:

- Pruebas de competencia
- Uso de materiales de referencia
- Pruebas de evaluación

Higiene

Así como la parte aptitudinal sobre el personal que se requiere, también se hace énfasis en los insumos, dotaciones y la asepsia correcta del equipo de trabajo, por ello, se recomienda tomar las siguientes precauciones:

- Ropa adecuada
- Elementos de protección personal
- Uñas limpias y cortas
- Lavado de manos
- Evitar hablar, toser
- No comer ni beber

3.2.2 Equipos

Es importante que previo a su uso:

- Comprobar que cada uno de los equipos cumpla con los objetivos previstos para su uso
- Observar que el funcionamiento del producto en el lapso de uso sea el adecuado
- Los equipos y los dispositivos de monitoreo deben calibrarse según patrones nacionales trazables, en conjuntos con las comprobaciones que permiten recalibrar, documentar y obtener fiables resultados. (ISO 7218)

3.2.3 Procedimiento de Trabajo

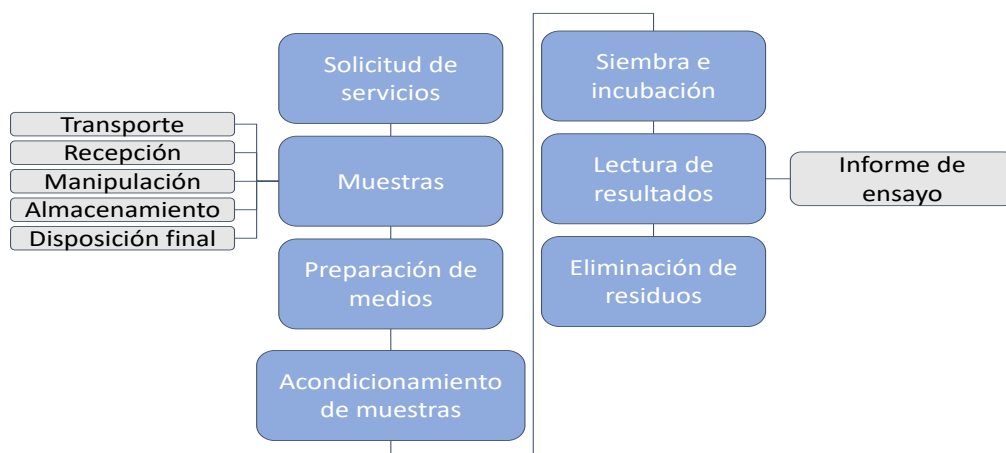


Figura 2 Flujo de Trabajo en un laboratorio de microbiología.

Fuente: ISO 7218:2013

3.2.4 Validación

Enfoque general para la confirmación y comprobación de métodos microbiológicos de referencia o alternativas partiendo de una revalidación primaria previa, basado en normas internacionales y guías técnicas con el fin de poder garantizar que el procedimiento empleado lleva a causa los criterios planteados para su utilidad prevista, permitiéndonos obtener resultados veraces. (ISO 16140-1)

Se debe verificar de acuerdo con la norma ISO 16140:

7.2.1.5 Cada laboratorio considerará validar que todos los métodos puedan llevarse a efecto antes de aplicarlos, confirmando que se logre el cometido solicitado. Esto se logra por medio de la comprobación de registros, considerando que si existiese sobre el procedimiento una reforma por la entidad que lo publicó, la revisión deba replantearse o replicarse en la medida que se requiera.

7.2.2.1 A todo laboratorio le compete aprobar las técnicas no reguladas, desarrolladas por el laboratorio y los metodologías normalizadas aplicadas independientemente de su extensión o que pudiesen cambiarse de forma. La validación requiere poseer una gama de espectro, cuando esta sea justificada y útil a fin de satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de aplicación asignado.

Diferencia entre validación primaria y secundaria

Validación primaria

- Se considera como el proceso experimental que con el objetivo de fijar limitantes a las operaciones y los elementos de un innovado método.
- Demostrar que un método es equivalente al método de referencia basado en criterios definidos para el método.

Validación Secundaria (Verificación)

Toma lugar cuando el laboratorio previamente ha buscado adherir un método de mayor escala y se plante recopilar sustentos y evidencias que el laboratorio es apto de satisfacer los requerimientos planteados en la validación principal.

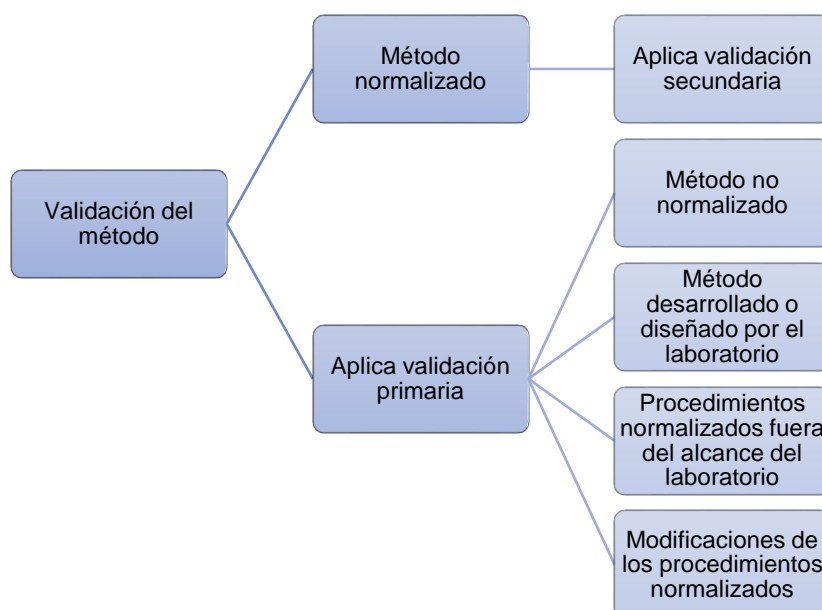


Figura 3 Validación de métodos.

Fuente: ISO 1640

Determinaciones de acuerdo con la guía de validación de métodos microbiológicos ISO 1640

Ensayos cualitativos	Ensayos cuantitativos
<ul style="list-style-type: none"> • Límites de detección • Pruebas de sensibilidad y la especificidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Precisión (Repetibilidad-Precisión intermedia) • Límite de cuantificación • Verificación de la veracidad

Los análisis para determinar son:

Ensayos cualitativos	Ensayos cuantitativos	
	Recuento de microorganismos totales	Recuento de microorganismos en medio selectivo diferencial
<ul style="list-style-type: none"> • Límite de detección • Sensibilidad • Especificidad • Inclusividad • Exclusividad • Robustez 	<ul style="list-style-type: none"> • Precisión (repetibilidad +Precisión intermedia) • Límite de cuantificación • Rango validado • Incertidumbre de medición • Robustez 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidad • Especificidad • Inclusividad • Exclusividad

3.3 Aseguramiento de la calidad

Para que un laboratorio considere la calidad de un producto es vital poseer un programa de actividades con el propósito de obtener resultados precisos y exactos para mejorar el funcionamiento.

Existen los controles de Calidad Interno y Externo, a decir de estos:

Control de Calidad Interno

Este tipo de control se prioriza en confirmar la coherencia de los resultados logrados a diario y, así como cumplir a cabalidad con los criterios previamente establecidos.

- ✓ Uso de cepas de referencias durante la realización del ensayo
- ✓ Participación en Ensayos Intralaboratorios cualitativos y cuantitativos

Control de Calidad Externo

En primero, el Ensayo de Aptitud (EA), que es llamado también Control de Calidad Externo (CCE), se establece como un recurso óptimo al momento de validar el control de calidad en conjunto con el eficiente proceso de análisis llevado a cabo por el laboratorio.

Los beneficios para el laboratorio son:

1. Demostración de validez de los resultados a terceras identidades
2. Monitorización de tendencias
3. Evaluación de métodos y procedimientos
4. Comparación del desempeño
5. Formación del personal

Los ensayos de aptitud funcionan con las normativas de:

- ISO/IEC 17043 “Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para los ensayos de aptitud”
- ISO 13528 “Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons”

CAPÍTULO 4

4.METODOLOGÍA

4.1 Metodología para revalidación del método

Para obtener resultados confiables en el laboratorio de la planta de semielaborados de cacao con el método de análisis de recuento de aerobios mesófilos, se lo realizó en tres etapas:

- 1) Diagnóstico inicial,
- 2) Implementación del método estandarizado,
- 3) Prueba Inter comparación

4.1.1 Diagnóstico inicial

a. Cumplimiento de los requisitos del método

Para realizar la validación del método de recuento de aerobios mesófilos, lo primero que se hizo fue un diagnóstico inicial, donde se evaluó como se estaba ejecutando el método AOAC 990.12, para lo cual se empleó una lista de comprobación.

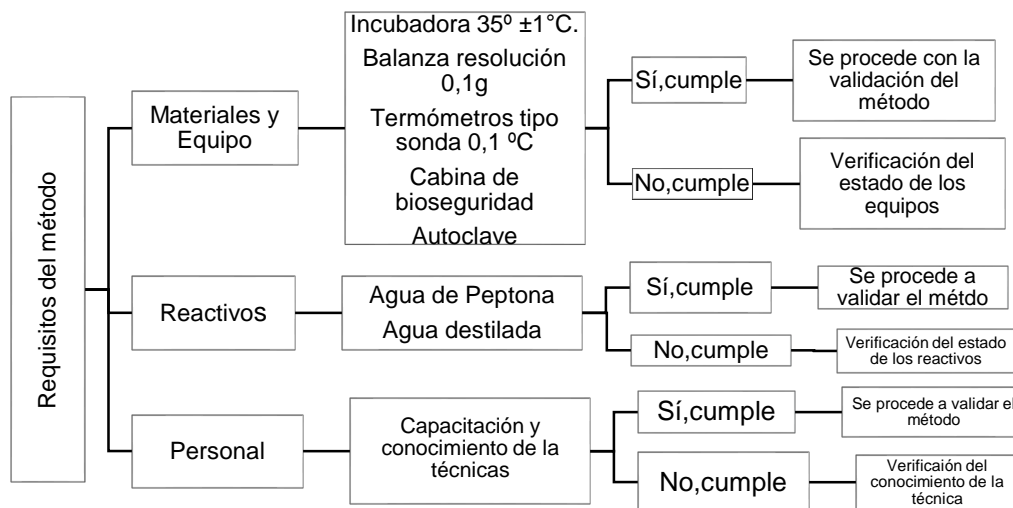


Figura 4 Requisitos del método AOAC 990.12

Fuente: propia autoría

Tabla 4

Lista de comprobación

Requisito del método	Sí	No	Observaciones
Materiales y Equipos		X	No existen registro y ni se realiza verificación de las incubadoras, no se está trabajando con material estéril como cucharas (utilizan cucharas desechables no estéril)
Reactivos		X	No se lleva registro de control de la fecha de caducidad, ni las cantidades que se utilizan
Personal		X	Personal no está capacitado, ni calificado para realizar la técnica de análisis. Realiza el conteo de forma inapropiada. Ej. Promedio de conteo de dos diluciones diferentes
Ambiente		X	No existen registro ni control del ambiente

Fuente: propia autoría

b.-Cumplimiento de los requisitos de la normativa

Existen otros requisitos que son parte de la norma ISO 7218 para asegurar la calidad del resultado, entre ellos las instalaciones del laboratorio.

Se realizó un chequeo de la infraestructura del laboratorio para verificar si cumplía como establece la normativa.

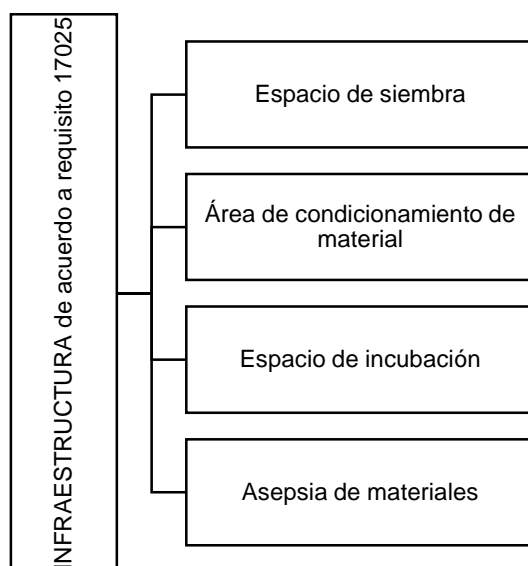


Figura 5 Requisito de Infraestructura de acuerdo con la normativa 17025

Fuente: propia autoría

No cumple con el requisito ISO 17025, solo existe un cuarto pequeño para realizar la siembra, incubación y preparación de material, el área de microbiología debe ser reformada para contar con 4 áreas: siembra, preparación de material, incubación y lavado de material. Por el momento, para validación es indispensable al menos un área de siembra con cabina de bioseguridad (manejo de cepas) y un área para incubación que será compartida con el área lavado/esterilización de material.

4.2 Implementación del método estandarizado

Para proceder a la implementación del método, se requiere validarlo.

La validación es el procedimiento mediante el cual se verifica que el método cumple con el fin previsto, esto es que cumple con los requisitos previamente establecidos por la organización que desarrolló el método en cuanto a selectividad, límite de detección, exactitud, precisión entre otros parámetros para evaluar el desempeño.

4.2.1 Esquema (Árbol de decisión)

Para validar el método se realizó el bosquejo que resume al proceso de validación:

1. NECESIDAD ANALÍTICA (se plantea por la jurisdicción del laboratorio, con la urgencia hacia satisfacer una petición metódica).

Sí, necesitamos validar el método de Recuento de aerobios mesófilos para estandarizarlo.

2. MÉTODO (examinación, disponibilidad y elección de metodologías idóneas).

El método para validar es AOAC 990,12 "Recuento de microorganismo aerobios mesófilos". Ver Figura 7

3. BORRADOR DEL PROCEDIMIENTO (considerar los elementos constitutivos del contenido).

Al realizar el análisis del diagnóstico basado en los requerimientos del método, existió incumplimiento de todo el procedimiento del método, motivo por el cual no se puede proceder al siguiente paso.

4. "PUESTA A PUNTO (se considera que las variables del método correspondan a los criterios de validación y que estos sean aprobados).

No se puede ejecutar la puesta a punta porque no se realizó el paso 3.

5. ELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN (en correspondencias que las guías seleccionadas y aplicables se sujeten a la experimentación lograda en la puesta a punto, cuya severidad se conformar a que el método sea regulado o no).

No se pudo realizar este paso, por incumplimiento del procedimiento del método.

6. FIJACIÓN DE OBJETIVOS PARA LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN (a partir de la puesta a puntos se considera que las referencias bibliográficas aplicadas gocen de probidad).

No se pudo realizar este paso, por incumplimiento del procedimiento del método.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ESTADÍSTICO (que parte desde la obtención de los estándares seleccionados a fines al procedimiento).

No se pudo realizar este paso, por incumplimiento del procedimiento del método

8. REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS DISEÑADOS (en correspondencia al procedimiento (borrador), se confirma que las evidencias fueron registradas y completadas a cabalidad).

No se pudo realizar este paso, por incumplimiento del procedimiento del método.

9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS (los criterios de validación se fundamentan en la obtención de datos fidedignos arrojados por el mismo laboratorio).

No se pudo realizar este paso, por incumplimiento del procedimiento del método.

¿Cumplen objetivos predefinidos?

SÍ	Método validado, pasar a 10
NO	Analizar incumplimientos y buscar posibles causas ¿Se han encontrado posibles razones?
SÍ	Corregir y volver a 7/8
NO	¿Se pueden cambiar objetivos?
SÍ	Cambiar y volver a 6
NO	Volver a 4

10. HACER DECLARACIÓN DE MÉTODO VALIDADO

No se pudo realizar este paso, por incumplimiento del procedimiento del método.

11. GUARDAR REGISTROS ORDENADAMENTE.(EURACHEM, n.d.)

No se pudo realizar este paso, por incumplimiento del procedimiento del método.

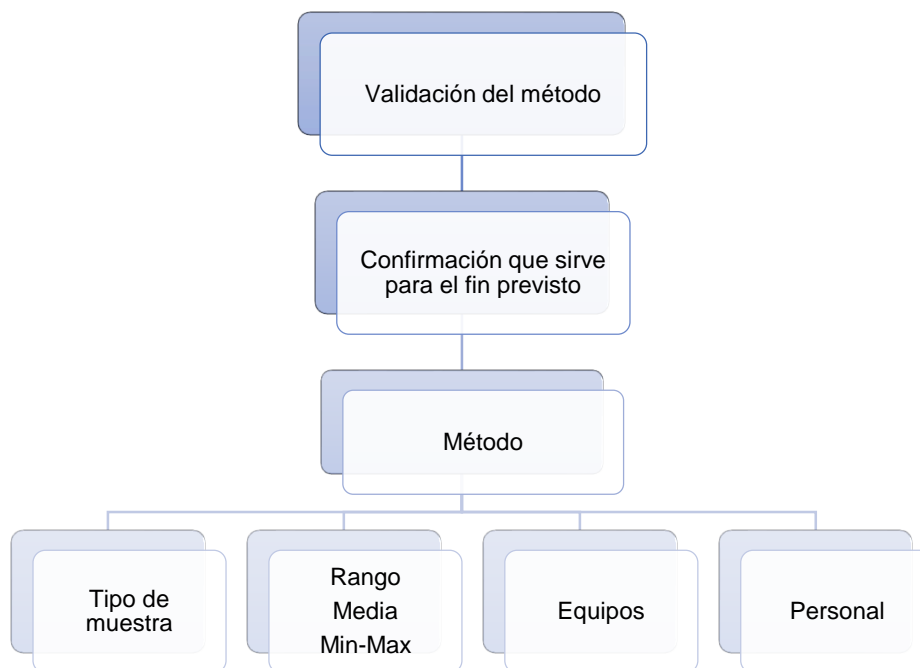


Figura 6 Validación del método.

Fuente: propia autoría

Para proceder a validar el método, se debe demostrar que el método:

- Es útil para el propósito definido,
- el rango de medición que indica el método,
- equipos que cumplan especificación como solicita el método y,
- poseer personal con competencia técnica para el desarrollo del método

4.2.2 Diseño experimental

De acuerdo con la evaluación del diagnóstico del método AOAC 990,12 "Recuento de microorganismo aerobios mesófilos". Se determina su incumplimiento en los requisitos del método.

Por este motivo no se puede proceder con el diseño experimental que consiste en:

4.2.2.1 Selectividad/ Especificidad

✓ Procedimiento

Realizar inóculos usando una bacteria ATCC de tipo aeróbica y una bacteria no aeróbica para determinar la capacidad del método de identificación de bacterias objeto de estudio.

Cepas ATCC target (aeróbicas) E. coli ATCC 25922, No target Aspergillus ATCC 16888.

El analista debe sembrar 5 muestras inoculadas con la cepa target y con la cepa no target. Evaluar los resultados.

✓ **Documentación**

- Registrar los datos de los inóculos realizados
- Conservar la hoja técnica de las cepas ATCC
- Registrar los resultados obtenidos

✓ **Criterio de aceptación**

Se considera aceptable cuando se obtenga un resultado con crecimiento de cepa aeróbica en al menos 4 de las 5 muestras sembradas. La bacteria no target no deberá tener crecimiento.

4.2.2.2 Límite de detección

✓ **Procedimiento**

Ejecutar el proceso de ensayo, 10 veces de forma individual. Sembrar reemplazando la muestra por agua destilada estéril. Repetir el proceso de ensayo usando una muestra de polvo de cacao previamente esterilizada. Sembrar en diluciones de 1/10, 1/100/ 1/1000.

✓ **Documentación**

Registrar los datos de medios de cultivo (agua de dilución, petrifilm), incluyendo fecha de siembra, marca, lote, resultados por cada dilución. Obtener el promedio de los datos.

4.2.2.3 Límite de cuantificación

✓ **Procedimiento**

Ejecutar el proceso de ensayo, 10 veces de forma individual. Sembrar usando una muestra de polvo de cacao previamente inoculada con la cepa ATCC E. coli ATCC 25922 en la concentración más baja del inóculo de forma tal que se estime obtener 1 colonia por cada ml.

✓ **Documentación**

Registrar los datos de medios de cultivo (agua de dilución, petrifilm), incluyendo fecha de siembra, marca, lote, resultados por cada dilución. Obtener el promedio de los datos.

4.2.2.4 La exactitud

✓ **Procedimiento**

En este apartado se describe la determinación de la precisión, que debe considerar para fijar a través del Material de Referencia Certificado (MRC), disponiéndose así la aplicación del CRM en consecuencia a su requerimiento. El procedimiento se obtiene al detalle desde la normativa ISO 5725-4.

Se plantea una ejemplificación para su comprensión:

Se analizará 3 muestras idénticas inoculadas con MRC (Cepas ATCC) considerando las instrucciones de ensayo del método, que permite determinar la cantidad de colonias en cada una de dichas muestras, de existir MRC en diferentes niveles de concentración trabajar con un nivel, alto, medio y bajo.

✓ Documentación

Deduzca la media, la desviación estándar y la varianza de las concentraciones dadas. Estime la precisión dividiendo la concentración promedio observada por el valor certificado y multiplicando el resultado como porcentaje por 100:
 Veracidad (%) = concentración promedio observada (después de ingresar el factor del factor de recuperación) $\times 100$ / valor certificado.

Así, se concuerda qué disponer de MRC, sobre la exactitud, que puede proyectarse en incidencias, como se expone en el punto 4.2.2.2

✓ Criterios de aceptación

Son los definidos en el apartado 4.2.2.2

4.2.2.5 La recuperación

✓ Procedimiento

Al tener acceso a recursos de referencia certificados, se considera determinar la incidencia a través de procesos experimentales, para muestra el siguiente ejemplo de procedimiento:

Prepare muestras en tres niveles diferentes o cinco concentraciones diferentes del inóculo diferentes, que van desde aproximadamente el 50% (concentración más baja) hasta el 150% (concentración más alta) del rango de trabajo esperado o 1, 1,5 y 2 veces el límite de rendimiento mínimo requerido o 0,5, 1 y 1,5 veces el límite permisible, analice las muestras y calcule la concentración de cada muestra. Aplicar un mínimo de seis muestras por concentración para luego examinar dichas muestras sobre el método establecido, usando la matriz) polvo de cacao del producto.

✓ Documentación

Informe el valor teórico, el valor del ensayo y el porcentaje de rendimiento de cada muestra. Calcule la, la desviación estándar, la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) y el porcentaje de rendimiento para todas las muestras % de rendimiento = $100 \times$ concentración medida/nivel de enriquecimiento. Siga los resultados en una hoja de datos.

✓ Criterio de Aceptación

La estadística arroja que el porcentaje de recuperación oscila entre el 80 y 110% del valor teórico.

4.2.2.6 Repetibilidad

✓ Procedimiento

Se considera dos posibilidades de procesos a llevar a efecto y establecer la precisión intraensayo, o repetibilidad, ensayando con submuestras de una misma muestra homogénea, bajo iguales condiciones de trabajo a lo largo de una pausa corta de tiempo:

- α) Hacer al menos 9 determinaciones que cubran el rango especificado para el análisis, es decir 3 repeticiones para a cada una de las 3 concentraciones del inóculo (diferente) bajo (límite de cuantificación), media y alta (25% superior al límite máximo permitido).
- β) realizar un límite de 6 determinaciones a una concentración del inóculo que obedezca a la muestra del problema.

✓ **Documentación**

Asentar en el formato correspondiente los resultados logrados, junto con los cálculos de la media y el(los) criterio(s) de dispersión seleccionado(s) (desviación estándar, varianza o pausa de confianza).

✓ **Criterio de Aceptación**

Se establece acorde a un valor máximo aceptable para el parámetro de dispersión escogido, según el tipo de análisis y su propósito específico.

4.2.2.7 Precisión Intermedia

✓ **Procedimiento**

Desde un diseño experimental en concreto se evalúa las circunstancias aplicadas al método, considerando que se minimice la cantidad de experimentos y se incluya las variaciones del día a día, las variaciones de análisis y de equipo; permitiéndose contar con una imprecisión en el estudio, mas, si no se ha establecido reproducibilidad intralaboratorio.

✓ **Documentación**

Documentar los resultados obtenidos en el formato correspondiente de datos, así como los cálculos de la media, la desviación estándar, varianza y el intervalo de confianza.

✓ **Criterio de Aceptación**

Se aproxima a una mayor gama de variabilidad, similar a la repetibilidad.

4.2.2.8 Reproducibilidad

✓ **Procedimiento**

Preparar muestras para análisis con muestras que cubran el rango definido para el análisis, esto es, 3 réplicas de tres (diferentes) concentraciones de inóculo baja (límite de cuantificación), media y alta (25% superior al límite máximo permitido). En cada nivel, el análisis debe realizarse en al menos seis muestras idénticas. Repita estos pasos al menos otras dos veces más con diferentes operadores. Analice las muestras.

✓ **Documentación**

Documentar los resultados obtenidos en el formato correspondiente de datos, así como los cálculos de la media, la desviación estándar, varianza y el intervalo de confianza.

✓ **Criterio de Aceptación**

Se aproxima a una mayor gama de variabilidad, similar a la repetibilidad.

4.2.2.9 Intervalo de trabajo

✓ **Procedimiento**

Repasar los resultados de ensayo para todos los componentes requeridos de un método específico.

✓ **Documentación**

Evidenciar en registro el rango en el formulario de datos.

✓ **Criterio de Aceptación**

Determinar el rango de las concentraciones del inóculo en las cuales la precisión y exactitud cumplen con su respectivo criterio de aceptación.

Normalmente estará comprendido entre el Límite de Cuantificación y el valor asignado a la mayor concentración de inóculo utilizado.

4.2.2.10 Robustez

✓ Procedimiento

La determinación de la capacidad del método para no verse afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en las condiciones de trabajo, se logra al considerar aquellas condiciones que, durante el desarrollo del método, se vio pueden afectar los resultados. El procedimiento es específico para cada caso; por ejemplo: cambio de temperatura (34 o 36 °C), peso de muestra, tiempo de incubación, etc.

✓ Documentación

Los resultados obtenidos se colocan en el registro y formato correspondiente, así como la emisión de la información sujeta a la evaluación, considerando que existiese una diferencia de la media obtenida entre las condicionantes que las constituyen, clarificadas por su significancia estadística; aplicables de igual forma en la diferenciación del parámetro de dispersión seleccionado.

✓ Criterio de Aceptación

A decir del tipo de análisis y su finalidad específica, se determina un parámetro plausible a un valor máximo permitido de cada valoración, en consecuencia un rango de probabilidad estadística otorgado; así como para el parámetro de dispersión elegido.

4.2.2.11 Reproducibilidad

✓ Procedimiento

Debe considerarse cuando se pretenda regular un método, y se establezca su traslado, que ambos laboratorios tengan similares procesos y estructuras en sus dependencias al momento de enfrentarse a análisis homogéneas reguladas por igual en proceso experimental.

✓ Documentación

En la parafernalia experimental y procedimental deben registrarse como evidencia todo lo realizado, aplicable por igual en la toma de resultados y cálculo de la media y del parámetro de dispersión escogido (desviación estándar, desviación estándar relativa (coeficiente de variación) o intervalo de confianza) de cada uno de los dos laboratorios. Los datos obtenidos deben informarse y establecerse las diferencias entre los resultados obtenidos por el laboratorio destino y por el laboratorio de origen.

✓ Criterio de Aceptación

A considerar del tipo de análisis y el fin específico del estudio, se determina un criterio considerado a un valor máximo aceptable que permita fijar las medias de los dos laboratorios en consonancia a un rango de probabilidad estadística emitido; al igual que el parámetro de dispersión elegido.

4.2.2.12 Declaración de método validado. Registros

Como se ha mostrado, luego que los objetivos definidos previamente hayan cumplido a cabalidad, se comprenderá que el método es aprobado.

Dicha declaración formal, en la que se recogen las características del método (parámetros de validación), se realiza en el formato del informe de validación que se elabora para cada parámetro a validar o verificar.

Como amparo del proceso, se resguardarán los todos los registros con el propósito de validar el sistema de la calidad establecido. A saber:

- Necesidad analítica
- Parámetros de validación seleccionada y objetivos previamente establecidos
- Diseño experimental y descriptivo realizado
- Evidencias e informe de ensayos llevados a cabo
- Resolución de los antecedentes (datos) alcanzados
- Afirmación y divulgación del método aprobado

4.2.2.13 Control del método. Revalidación

El método estandarizado puede ser monitoreado desde las llamadas cartas de control, que consiste tomar un modelo y someterlo de 10 a 20 ensayos reiterativos, tabulando sus resultados que se calculan desde el valor medio y la desviación estándar. Para ellos, se debe establecer límites de confianza del valor medio más dos desviaciones estándar y el valor medio menos dos desviaciones estándar, denominados límites superior e inferior. Luego de realizado esto, se continúa con una partida analítica, se replantea el método estandarizado: corre de la misma forma la muestra o patrón con la que se elaboraron los límites y se registra el dato obtenido. Estos registros se ubican en forma distributiva normal en torno a de la media. Es importante resaltar que, si cinco datos concatenados registran una alta o baja tendencia al borde de la media, se interpretará que los datos que se obtengan no podrán aplicarse y reportarse a una sexta lectura; considerando para efecto verificar exhaustivamente la metodología que se ha planteado para el análisis.

Todo procedimiento se considerará como válido hasta que no se registren cambios que confirmen lo contrario, en consecuencia que **la validación es una etapa de actividades progresivas**, que se construye, principalmente, de las estadísticas tabuladas de diversas acciones ejecutadas en el campo de la calibración y del control de calidad, que se obtiene del resultado de actividades progresivas y, de ser necesario modificar los límites de aplicación del método, y si se produce esta situación, deberemos proceder a una nueva declaración de validación, apoyada en todos los registros que la soportan.

4.3 Pruebas de intercomparación o ensayo de aptitud

4.3.1 Metodología:

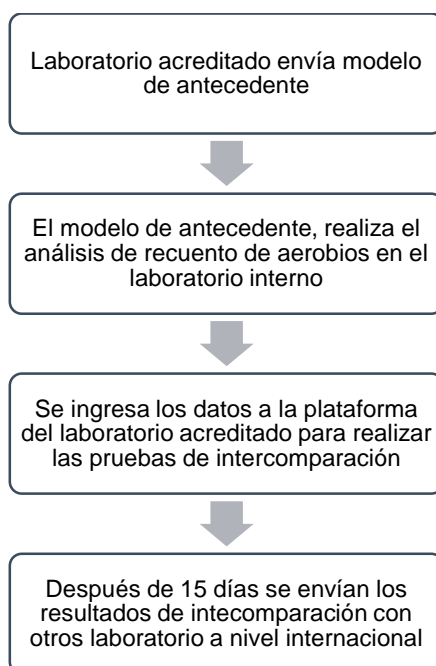


Figura 7 Resumen de la metodología.

Fuente: propia autoría

A continuación se describe el ingreso al portal para las pruebas de proeficiencia:

1. Ingreso al portal de Standard

<https://portal.lgcstandards.com/login>

Lab ID

Username

Password

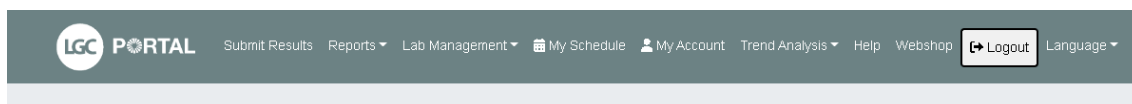
→ Login

If you have any queries regarding your user account please contact us. For LGC PT participants contact axiopt.results@lgcgroup.com. For Thistle QA participants contact thistleqa@lgcgroup.com
 I have forgotten my password

2. Ingresar la información correspondiente en cada sección:

LAB ID:
 USUARIO:
 CLAVE:

3. Darle click en la sección Submit Results



4. Sección “submit results”

Home / Round Selection

Scheme	Round	Status	Open Date	Deadline Date		
Chocolate (QCS)	CT317 - (Round 317) 17 Oct 2022		05-09-2022	17-10-2022	Performance Score Calculator	View Result

Seleccionar el candado, cuando aún no hay resultados aparece en color verde. Cuando ya está cerrado el plazo de ingreso sale color rojo.

5. Se despliega esta página, donde están todos los ensayos los cuales están para realizar las pruebas.

LGC PORTAL [Submit Results](#) [Reports](#) [Lab Management](#) [My Schedule](#) [My Account](#) [Trend Analysis](#) [Help](#) [Webshop](#) [Logout](#) [Language](#)

Home / Result Entry

Round: CT317 - (Round 317) 17 Oct 2022 Lab Id: CT1186 (CHOCOLATES FINOS NACIONALES COFINA)

Filter result grid by:

Sample Analyte Your Ref Instrument Ref Analyst [Remove Filters](#) [Print Template](#) [Print](#) [Export Registered Analytes and Methods](#)

* Mandatory field | LOQ or LOD = Numeric | Only rows with results are saved | Other Method = Please give comments

What date did you receive your samples? [Calendar](#)

710A - Salmonella (P/A) Sample Analysis Date

Analyte	Analyst	Methods	Your Ref	Not Testing	Analysis Date	Nominated	Comments
Salmonella species	Lab Result		Reveal 2.0 for Salmonella test	<input type="checkbox"/>	2022-09-22	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="text"/>

Result

En cada una de las secciones de analitos, se registró la persona que realizó los análisis, los resultados obtenidos, el método empleado, referencia de método, algún comentario y la fecha que se realizó el análisis.

Se realizó la prueba de aptitud y los resultados fueron **Resultados Insatisfactorios**, con estos resultados se empezó a trabajar con la validación de los métodos microbiológicos y la remodelación del laboratorio.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS OBTENIDOS

Las actividades que se efectuarán para la validación del método se detallan en la tabla 8

Tabla 8

Actividades para ejecutarse

Etapas	Actividad	Nov.	Dic.	En.	Febr.
Diagnóstico inicial	Evaluación de métodos	X			
	Adecuación de Infraestructura física		x		
	Adquisición de material de referencia		x		
	Adquisición de equipamiento			x	
	Calibración de equipos			x	
	Puesta a punta de métodos			x	
Implementación del método estandarizado	Fijación de objetivos de variación				x
	Validación				x
	Robustez				x
Verificación del método	Evaluación de resultados				x
	Declaración del método validado				x

Fuente: propia autoría

5.1 ACTIVIDADES EJECUTADAS

Las actividades que se han efectuado hasta la fecha de hoy son las siguientes:

5.1.1 Diagnóstico Inicial

5.1.1.1 Evaluación de métodos

Actividades efectuadas:

- Revisión del método AOAC 990.12.
- Capacitación al personal: Fundamentos de microbiología, Requisitos de desempeño en parámetros microbiológicos para validación de métodos. La capacitación incluyó los procesos de siembra, conteo, interpretación de datos, evaluación de resultados.

5.1.1.2 Evaluación de infraestructura

Se realizó una evaluación de diagnóstico para determinar el cumplimiento de las áreas del laboratorio con los métodos que serán objeto de validación: Aerobios mesófilos, mohos y levaduras, salmonella.

Para los ensayos microbiológicos (aerobios, mohos, salmonella) se requiere el diseño y construcción de un laboratorio que tenga áreas separadas:

- Preparativos de medios de cultivo
- Incubación
- Siembra
- Limpieza de material (post incubación/ siembra)

Actualmente se cuenta únicamente con un espacio para incubación. No existe área estéril para siembra, ni espacio para lavado de material por lo que se tiene el riesgo de contaminación.

Esta actividad se encuentra en proceso, estamos en la primera etapa de levantamiento y elaboración de los planos del laboratorio.

5.1.1.3 Adquisición de materiales de referencia

Se adquirieron las cepas ATTCC:

- Aspergillus ATCC 16888
- E. coli ATCC 25922

5.1.1.4 Adquisición de equipos

Las cotizaciones fueron evaluadas si cumplen con los requisitos técnicos. Las cotizaciones fueron incluidas en un cuadro para comparar otras características como son tiempo de entrega y tiempo.

5.1.1.5 Calibración de Equipos

Los equipos fueron calibrados por Elicrom, laboratorio acreditado ISO 17025. Los equipos calibrados son: balanza gramera, incubadora a 35°C, micropipeta (10-1000ul).

5.1.2 Implementación del método estandarizado

Se realizó un procedimiento interno de ensayo, así como los registros para trazabilidad, basado en la normativa AOAC 990.12. Procedimiento AAC-009

El personal ejecuta el ensayo conforme al procedimiento desarrollado.

5.1.3 Verificación del método

Los resultados obtenidos son:

Selectividad
Diseño Experimental
Sembrar 5 muestras con cepas E.Coli ATCC 25922 y 5 muestras Aspergillus ATCC 16888
E.Coli
Resultados
6,8x10 ⁴
7,2x10 ⁴
6,5x10 ⁴
7,0x10 ⁴
7,4 x10 ⁴
Aspergillus
<10
<10

<10
<10
<10

Evaluación: Se cumple el objetivo de selectividad y especificidad.

Límite detección
Diseño Experimental
Sembrar utilizando 10ml de agua destilada + agua peptonada, sembrar en placa petrifilm por 10 ocasiones
Resultado
<10
<10
<10
<10
<10
<10
<10
<10
<10
<10
<10
<10

Límite de cuantificación
Diseño Experimental
1.- Esterilizar una muestra de polvo de cacao alcalino a 180° por 20 minutos.
2.- Preparar diluciones a partir de inóculo madre de ATCC 25922, hasta una dilución de 10 ⁶ , disminuyendo la carga bacteriana para inocular la muestra .
3.-Inocular el polvo de cacao con la cepa ATCC25922
4.- Se siembra 10 muestras inoculadas de forma individual

Resultado	
1*10 ²	100
2*10 ²	200
1*10 ²	100
2*10 ²	200
1*10 ²	100
2*10 ²	200
1*10 ²	100
2*10 ²	200
1*10 ²	100
2*10 ²	200

Exactitud					
Diseño Experimental					
1.-Hisopar o activar la cepa ATCC25922 E coli, incubar por 48 horas a 35 °C, preparar 7 diluciones considerando la escala Mc Farland					
2.- Inocular muestras de polvo de cacao con inculo de 10 ⁷ , 10 ⁵ y 10 ³					
Resultado					
Alto	CV	Medio	CV	Bajo	CV
4300000	7.50%	530000	6.00%	1800	-10.00%
3900000	-2.50%	550000	10.00%	2200	10.00%
4100000	2.50%	520000	4.00%	2100	5.00%

Evaluación: Se cumple el objetivo de una variación $\leq 10\%$.

ESTUDIO DE PRECISIÓN

REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

$p = 3$
 $n = 3$
 $p = \#$ de grupos
 $n = \#$ de datos
 v_i grados de libertad
 en cada grupo de ensayo

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (n)	cuadrado medio (MS)
Entre-grupos SS_e	$SS_e = SS_t - SS_d$	$v_e = p - 1$	$MS_e = \frac{SS_e}{v_e}$
Dentro-grupos SS_d	$SS_d = \sum v_i S_i^2$	$v_d = p(n - 1)$	$MS_e = \frac{SS_e}{v_e}$
Total SS_t	$SS_t = v_t S_t^2$	$v_t = pn - 1$	--

NIVEL BAJO

	Día a	Día 2	Día 3
Réplica 1	180	230	190
Réplica 2	220	220	210
Réplica 3	190	180	200
\bar{x}	197	210	200
s	20.817	26.458	10.000
s^2	433.3	700.0	100.0
v	2.0	2.0	2.0
$v s^2$	866.7	1400.0	200.0

Muestra	s_d	s_e	u_p	media(\bar{x})	U	RSD _{iR}	RSD _{iR}
Polvo de cacao	26.874	0.000	26.874	207	53.748	13.00%	13.00%

NIVEL MEDIO

	Día a	Día 2	Día 3
Réplica 1	4800	4500	4900
Réplica 2	5200	4900	4700
Réplica 3	4900	5100	5100
\bar{x}	4967	4833	4900
s	208.167	305.505	200.000
s^2	43333.3	93333.3	40000.0
v	2.0	2.0	2.0
$v s^2$	86666.7	186666.7	80000.0

Muestra	s_d	s_e	u_p	media(\bar{x})	U	RSD _{iR}	RSD _{iR}
Polvo de cacao	242.670	0.000	242.670	4900	485.341	4.95%	4.95%

NIVEL ALTO

	Día a	Día 2	Día 3
Réplica 1	37000	40000	39000
Réplica 2	32000	36000	41000
Réplica 3	41000	42000	38000
\bar{x}	36667	39333	39333
s	4509.250	3055.050	1527.525
s^2	20333333	9333333.3	2333333.3
v	2.0	2.0	2.0
$v s^2$	40666667	18666667	4666666.7

Muestra	s_d	s_e	u_p	media(\bar{x})	U	RSD _{iR}	RSD _{ir}
Polvo de cacao	3.265.986	0.000	3.265.986	38444	6.531.973	8.50%	8.50%

Evaluación Se cumple el objetivo en los 3 niveles con una R y r $\leq 10\%$.

	Laboratorio de semi elaborados de cacao	Laboratorio certificado N°1	Laboratorio certificado N°2
Réplica 1	1800	2300	1900
Réplica 2	2100	1900	2000
Réplica 2	1700	2000	2200
\bar{x}	1867	2067	2033
s	208,1670	208,1670	152,7530
s^2	43333,3	43333,3	23333,3
v	2	2	2
$v s^2$	86666.7	86666.7	46666.7

REPRODUCIBILIDAD INTERLABORATORIO

Muestra	s_d	s_e	u_p	media(\bar{x})	U	RSD _{iR}	RSD _{ir}
Polvo de cacao	191.485	0.000	191.485	1989	383.0	9.63%	9.63%

Evaluación: Se observa que el método cumple con el objetivo de Reproducibilidad $\leq 10\%$.

5.1.4 Declaración del método validado

Con los resultados obtenidos en la validación se puede determinar que se ha corregido el problema inicial. Al comparar el resultado dentro del laboratorio y entre laboratorios se concuerda que el método es aceptable, quedando así validado.

5.2 Análisis de prueba de competencia

Las pruebas de competencia son un recurso seguro de la calidad, que otorga a los laboratorios cotejar su ejercicio profesional y de estudio con sus pares, así como identificar estilos y, por consiguiente, concientizar en la toma de prácticas preventivas o correctivas con el propósito de comprometerse en altas competencias técnicas y de continua mejora.

5.2.1 Informe de prueba de desempeño

El laboratorio en estudio se sometió a la prueba de proeficiencia, donde los resultados no fueron satisfactorios, motivo por el cual se empezó este estudio de validación del método de recuentos de aerobios mesófilos.

A continuación se detalla los resultados:

- a) Una vez cerrada la ronda, se analizan los resultados y determinan el valor asignado para cada analito, de acuerdo con los criterios previstos en el.

Analyte: Total aerobic mesophilic count

Results

Sample	Method	Result	Unit	Perf Score	Score Type	% Diff
713	Petrifilm	<100	cfu/g		zScore	

Figura 8 Analito Total aerobic mesophilic count

(Fuente: Informe de pruebas de intercomparación)

Analyte	Analyst	Method	Result	Units	Log ₁₀	Z Score	Assigned Value	Ux AV	SDPA	Exp.SDPA	Number of results	Median	Mean	Robust SD	SD	Your Reference
Total aerobic mesophilic count	Lab Result	Petrifilm	<100	cfu/g			5841	0.02	0.35	N/A	66	3.77	3.68	0.16	0.47	Petrifilm

Figura 9 Resultados de lecturas de recuentos de aerobios mesofilos

(Fuente: Informe de pruebas de intercomparación)

- b) El resultado obtenido en el laboratorio de semielaborados de cacao fue de <100 ufc/g de la muestra de referencia 713 chocolate.



Figura 10 Resumen de competencia.

(Fuente: Informe de pruebas de intercomparación)

Nuestros lectura de recuentos de aerobios mesófilos fue **<100 ufc/g** comparada con la muestra de referencia que tuvo un valor asignado de **5841 ufc/g** . Los resultados fueron **Resultados Insatisfactorios**

- c) Para datos cuantitativos, el resultado del participante, x , (o $\log_{10} x$ para datos microbiológicos) se convierte en una puntuación z usando la siguiente fórmula;

$$z = \frac{(x - X)}{SDPA}$$

Todos los resultados, incluidos los resultados excluidos, reciben una puntuación de rendimiento.

Descripción del esquema

En la descripción del esquema encontramos información de la trazabilidad cada valor asignado.

Assessment Statistics

Sample	713
Assigned Value (AV)	5841
AV Derived By	All data
Uncertainty of AV	0.02
SDPA	0.35
Satisfactory Range	3.07 to 4.47
Satisfactory z/z score	84.1%
Questionable z/z score	4.8%
Unsatisfactory z/z score	11.1%

Figura 11 Valores asignados a la muestra de referencia 713 chocolate

La evaluación del desempeño para una sola ronda, las puntuaciones z y z' se interpretan de la siguiente manera:

z/z' score	Interpretation	Colour coding
$ z \leq 2.00$	Satisfactory result	Green
$2.00 < z $ and < 3.00	Questionable result	Amber
$ z \geq 3.00$	Unsatisfactory result	Red
No score given	See below	No colour coding

Tabla 9.- Interpretación de z y z'

Analyte: Total aerobic mesophilic count

Histogram

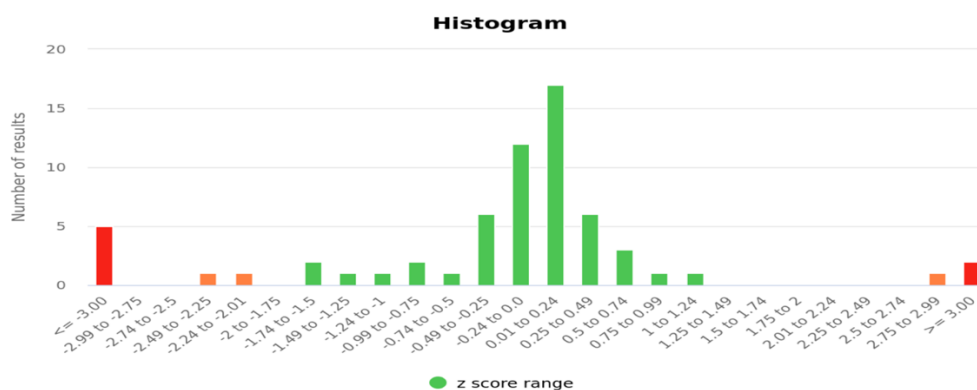


Figura 12 Puntuaciones z score range

(Fuente: Informe de pruebas de inter)

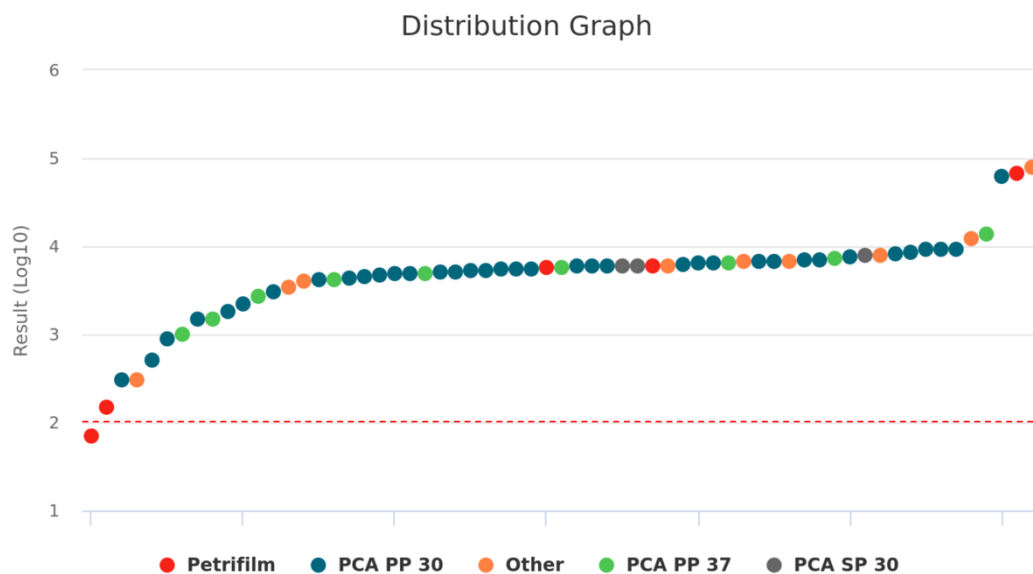


Figura 13 Gráfico de distribución.

(Fuente. -Informe de pruebas de intercomparación)

Los resultados que han sido clasificados como errores graves se truncan para fines de visualización en este gráfico, las líneas punteadas muestran los valores mínimos o máximos para los resultados que se mostrarán sin recorte. Cuando los resultados están truncados, se muestran con un valor de límite mínimo/máximo +/- la mitad del SDPA aplicable. Si no hay una línea punteada, esto indica que no hay errores graves o errores graves que trazar.

Al obtener resultados insatisfactorios en los ensayos de aptitud, se procede a ejecutar el plan de mejora que reside en ejecutar variedad de actividades, al detalle:

- ✓ Revisión de los equipos y reactivos que cumplan con el requisito del método,
- ✓ Las instalaciones del laboratorio se encuentren bien distribuidas entre sus áreas,
- ✓ Ejecutar la validación del método de recuento de aerobios mesófilos.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

1. Con los resultados de la evaluación del estado actual del laboratorio, se empezó a trabajar con las mejoras de infraestructura, adquisición de equipos certificados y calibrados, cumpliendo de esta manera con los requisitos que exige el método normalizado.

2. Una vez validado el método se estandarizó el método de recuento de aerobios mesófilos.

3. Se logró validar el método microbiológico de recuento de placas de aerobios mesófilos, se obtuvo niveles altos de precisión y veracidad en los análisis es decir confiabilidad en los resultados.

Se comprobó que, los resultados son repetibles y reproducibles, puesto que en los tres niveles se obtuvo R y $r \leq 10\%$, lo cual indica que la técnica de recuento de aerobios mesófilos cumple con el parámetro estadístico de precisión.

6.2 Recomendaciones

1. Al obtener confiabilidad en los resultados emitidos por el laboratorio de la técnica de recuento de aerobios mesófilos se recomienda aplicarla en los controles productivos de la planta y producto terminado, por lo cual se sugiere también actualizar el plan de muestreo en función de producción e incrementar el nivel del muestreo en el producto.

2. Participar en las pruebas de Inter comparación para confirmar la precisión y veracidad de los resultados y continuar con las mejoras .

BIBLIOGRAFÍA

1. FAO, FIDA, OMS, PMA y UNICEF. (2021). *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2021. Transformación de los sistemas alimentarios en aras de la seguridad alimentaria, una nutrición mejorada y dietas asequibles y saludables para todos*. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cb4474es>
2. Magnusson and U. Ornemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed.2014). ISBN 978-91-87461-59-0.
3. Ministerio de Salud Presidencia de la Nación. (2014). *ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS MICROORGANISMOS INDICADORES*. (RED NACIONAL DE LABORATORIO OFICIALES DE ANALISIS DE ALIMENTOS), Vol. 3
4. Organización Panamericana de la Salud. (2021). *Evaluación de riesgos microbiológicos en alimentos. Guía para implementación de los países*.
5. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO, (1992). *Manuales para el control de calidad de los alimentos*. Estudio FAO: alimentación y nutrición; 14.
6. Pérez, S. (2013). *Determinación de la carga bacteriana de aerobios mesófilos y coliformes totales mediante la verificación previa de los métodos aoac 990.12 y 991.14, respectivamente, en alimentos preparados*. Quito - Ecuador, 2012-2013.
7. WORLD HEALTH ORGANIZATION.WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2018). *Sistema de gestion de la calidad en el laboratorio/quality management system in the laboratory*.