



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA
LA CUANTIFICACIÓN DE UN
MICROORGANISMO PROBIÓTICO (*Lactobacillus
acidophilus* La3) EN YOGUR**

Diana Marcela Rodríguez García

Universidad de Antioquia

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias,
Grupo de Biotransformación**

Medellín, Colombia

2019

Validación de una metodología para la cuantificación de un microorganismo probiótico
(*Lactobacillus acidophilus* La3) en yogur

Diana Marcela Rodríguez García

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Asesor (a):

Lisett Vanesa Wilches López
Bacterióloga y Laboratorista Clínica, MSc.

Línea de Investigación:

Alimentos

Grupo de Investigación:

Biotransformación

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias
Medellín, Colombia
2019

Dedicatoria

A mis padres

Por su apoyo, consejos, comprensión, amor y ayuda en los momentos difíciles. Les debo lo que soy como persona, como profesional, mi carácter, mi perseverancia, mi coraje para conseguir los objetivos propuestos y mi amor por Dios.

A la Cooperativa Colanta

Por facilitarme el tiempo y los recursos para realizar este trabajo de investigación.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento del Problema	1
1.2. Objetivos.....	3
1.2.1 Objetivo General	3
1.2.3 Objetivos Específicos.....	3
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Validación.....	5
2.1.1. Métodos Analíticos	5
2.2 Validación de un método alternativo	7
2.2.1 Técnicas para la validación.....	9
2.2.2 Parámetros de validación.....	10
2.3 Incertidumbre.....	14
2.4 Pruebas de significancia.....	15
2.5 Microorganismos probióticos	16
2.6 Método para el recuento de bacterias probióticas.....	18
3. METODOLOGÍA.....	20
3.1 Manejo de cepas y Técnica analítica	20
3.2. Técnica analítica	20
3.2.1. Recuento en placa.....	20
3.2.2 Generalidades del método alternativo	22
3.2.3 Insumos y Reactivos.....	23
3.3. Selección de parámetros	24
3.4 Evaluación de parámetros analíticos.....	24
3.4.1 Límite de detección y cuantificación	24
3.4.2 Linealidad.....	26
3.4.3 Veracidad	28
3.4.4 Evaluación de Inclusividad.....	30
3.4.5 Repetibilidad.....	32
3.4.6 Precisión intermedia.	34
3.5 Estimación de la incertidumbre	36

3.6 Tratamiento de los datos	36
4. RESULTADOS	37
4.1 Límite de detección y cuantificación	37
4.2 Linealidad	38
4.3 Veracidad	41
4.4 Inclusividad.....	43
4.5 Repetibilidad y Precisión intermedia	63
4.6 Estimación de la incertidumbre	66
5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	69
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	76
7. REFERENCIAS	77
ANEXOS.....	86

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de validación por tipo de prueba microbiológica	9
Tabla 2. Desviación estándar relativa esperada en función de ufc por placa (Convention, 2007).....	12
Tabla 3. Límite de detección para el recuento de <i>L. acidophilus</i> ATCC 314 en el medio de cultivo agar HHD a la temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas de incubación en anaerobiosis	37
Tabla 4. Datos de Linealidad para el recuento de <i>L. acidophilus</i> en muestra de yogur semidescremado Colanta® en el medio de cultivo agar HHD a la temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas de incubación en anaerobiosis.	38
Tabla 5. Estadísticas de regresión de la linealidad	40
Tabla 6. Análisis de varianza.....	40
Tabla 7. Resultados de la prueba de veracidad del agar HHD en Yogur	41
Tabla 8. Análisis de varianza.....	42
Tabla 9. Resultados de la prueba de inclusividad del medio HHD con cepas nativas y ATCC	43
Tabla 10. Colonias observadas en el estereomicroscopio utilizando el medio de cultivo agar HHD.	57
Tabla 11. Resultados de Repetibilidad	63
Tabla 12. Resultados de Precisión intermedia.....	63
Tabla 13. Análisis de varianza Nivel Bajo	64
Tabla 14. Análisis de varianza Nivel Medio	65
Tabla 15. Análisis de varianza Nivel Alto.....	66
Tabla 16. Caracterización de las fuentes de incertidumbre	67
Tabla 17. Incertidumbre del método.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Límite de detección y cuantificación	25
Figura 2. Linealidad.....	27
Figura 3. Representación de las siembras por duplicado en caja de Petri	28
Figura 4. Veracidad	29
Figura 5. Inclusividad.....	31
Figura 6. Representación de las pruebas ecométricas	32
Figura 7. Repetibilidad	33
Figura 8. Precisión intermedia por analista	35
Figura 9. Identificación de las fuentes de incertidumbre (X: Fuente que no se consideró) .	67

GLOSARIO

Agar: Sustancia mucilaginoso que se extrae de algunas algas, utilizada como medio de cultivo, en farmacia, en bacteriología y en ciertas industrias.

Aislar: Separar un microorganismo de otro para su identificación.

Cepa: Microorganismo viable de referencia que se utiliza para control de medios de cultivo y procesos microbiológicos.

Cepa de Referencia: Es una cepa proveniente de un cultivo puro, obtenidas directamente de una colección nacional e internacional reconocida, con su respectivo registro y certificado. Puede ser una cepa ATCC, cepa NCIMB o cepa NCTC.

Colonia: Formación visible en el agar, resultado de la reproducción de los microorganismos.

Confiabilidad: Es un término general cualitativo que expresa el grado de cumplimiento satisfactorio de un método analítico en términos de sus variados atributos técnicos (aplicabilidad, exactitud, precisión, sensibilidad y detectabilidad), siendo, por lo tanto, un concepto compuesto.

Error aleatorio: Componente del error de medida que en mediciones repetidas varía de manera impredecible. El error aleatorio es igual a la diferencia entre el error de medida y el error sistemático.

Error de medida: Diferencia entre un valor medido de una magnitud y un valor de referencia.

Exactitud: La exactitud es la proximidad de los resultados de la prueba obtenidos mediante el método de prueba respecto a los obtenidos por el método tradicional. Usualmente, la exactitud se expresa como el porcentaje de la recuperación de los microorganismos mediante el método de valoración.

Factor de cobertura: Número mayor que uno, por el cual se multiplica una incertidumbre estándar combinada de medida para obtener una incertidumbre expandida de medida. Usualmente se usa el símbolo K para el factor de cobertura.

Incertidumbre: Parámetro asociado a una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurado.

Inclusividad: capacidad de detectar el analito entre un amplio grupo de cepas diana.

Inóculo: Cantidad de muestra que se siembra que procede de una suspensión bacteriana con carga o no conocida.

Límite de cuantificación: El límite de cuantificación es el número más bajo de microorganismos que pueden contarse con exactitud.

Límite de detección: El límite de detección es el número más bajo de microorganismos en una muestra que puede detectarse bajo las condiciones experimentales establecidas.

Linealidad: La linealidad de una prueba microbiológica cuantitativa es su capacidad para generar resultados que sean proporcionales a la concentración de microorganismos presentes en la muestra dentro de un intervalo dado.

Mensurando: Magnitud propuesta para medirse. La especificación del mensurando requiere la descripción del estado del fenómeno, cuerpo o sustancia a la cual está asociada la magnitud; incluye las componentes necesarias y las entidades químicas involucradas. “Magnitud sujeta a medición”.

Muestra: Producto resultante de la operación de muestreo.

Nivel de confianza: Probabilidad de que el conjunto de los valores verdaderos de un mensurando esté contenido en un intervalo de cobertura especificado

Precisión: La precisión de un método microbiológico cuantitativo es el grado de coincidencia entre los resultados de las pruebas individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a muestreos múltiples de suspensiones de microorganismos de laboratorio a lo largo del intervalo de la prueba. La precisión de un método microbiológico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación).

Repetibilidad: Resultados de ensayos independientes obtenidos por el mismo método sobre elementos de ensayo idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y durante cortos intervalos de tiempo.

Reproducibilidad: Resultados obtenidos con el mismo método sobre elementos de ensayo idénticos en diferentes laboratorios, con diferentes operadores y usando equipos diferentes.

Sesgo: Diferencia entre el resultado esperado del análisis y un valor de referencia aceptado.

Validación inicial o completa: realizada con un protocolo extenso en el que se contempla una primera fase de validación por parte de un laboratorio experto y una segunda fase que incluye la realización de un ejercicio colaborativo con la participación de varios laboratorios, y que utiliza un diseño de experiencias y unos criterios de evaluación de resultados preestablecidos y reconocidos internacionalmente (como por ejemplo los recogidos en la Norma UNE EN ISO 16140:2003).

Validación interna o verificación: por parte del laboratorio de control que va a utilizar el método alternativo, que consiste básicamente en comprobar que el laboratorio es capaz de cumplir con los requisitos de funcionamiento del método previamente establecidos en las condiciones habituales de trabajo.

RESUMEN

Existe una alta variabilidad biológica y heterogeneidad en la distribución de los probióticos presentes en matrices alimentarias funcionales tipo yogur, sumado a la adición de cultivos iniciadores que le dan textura sensorial característica de este producto; por lo que se requiere una enumeración selectiva de las diferentes especies microbianas que los componen y su correcta identificación se dificulta, pues son muy pocos los medios de cultivo disponibles que sean lo suficientemente selectivos para permitir el aislamiento de cepas probióticas de poblaciones mixtas como las que están presentes en el yogur. Lo que hace necesario emplear metodologías validadas para el conteo in vitro de estos microorganismos que disminuyan la incertidumbre y garanticen resultados confiables, debido a que el número de bacterias benéficas es importante para ser declarado como alimento probiótico. Se ha adoptado el nivel mínimo recomendado de 10^6 UFC/mL o g, criterio normativo emitido por el Ministerio de Protección Social en la Resolución 333 del 2011 como requisito mínimo de bacterias lácticas probióticas. Por lo anterior, en la presente investigación se validó la metodología para el recuento de un microorganismo probiótico (*Lactobacillus acidophilus* La3) en yogur semidescremado utilizando el medio de cultivo diferenciador de homofermentadores y heterofermentadores (HHD), con los resultados obtenidos se encontró que el método es lineal, veraz y preciso con una incertidumbre combinada de 0.05 y expandida de 0.106 log 10 con un 95% de confianza. Se concluyó que el método analítico evaluado cumple con su uso previsto garantizando que la Cooperativa Colanta® emita un reporte de recuento confiable de este microorganismo en el producto final.

Palabras clave: Validación, probióticos, *Lactobacillus acidophilus*, yogur, HHD.

ABSTRACT

There is high biological variability and heterogeneity in the distribution of probiotics present in food matrices, yogurt-like functions, added to the source of initiating courses that give it a sensory texture characteristic of this product; Therefore, a selective enumeration of the different microbial species that compose it is required and its correct identification is difficult, since there are very few culture media that are selected to allow the isolation of the strains. They are present in yogurt. What is needed is necessary to use validated methodologies for the in vitro counting of these microorganisms that reduce the uncertainty and guarantee reliable results, because the number of beneficial bacteria is important to be declared as probiotic food. The recommended minimum level of 10^6 CFU/mL or g has been adopted, a normative criterion issued by the Ministry of Social Protection in Resolution 333 of 2011 as a minimum of probiotic lactic acid bacteria. Therefore, in the present investigation the methodology for the treatment of a probiotic microorganism (*Lactobacillus acidophilus* La3) in low-fat yogurt as the differentiating culture medium of homofermentators and heterofermenters (HHD) was validated. It is linear, accurate and accurate with a combined uncertainty of 0.05 and expanded from 0.106 log 10 with 95% confidence. It was concluded that the analytical method evaluated fulfills its intended use guaranteeing that Cooperativa Colanta® is a report of reliable counting of this microorganism in the final product

Keywords: Validation, probiotics, *Lactobacillus acidophilus*, yogurt, HHD.

INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del Problema

En la industria láctea, se utilizan cultivos iniciadores mixtos, entre los cuales se encuentra el conocido cultivo de yogur que contiene la mezcla de las cepas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. La introducción de microorganismos probióticos se refiere a la fabricación de nuevos productos que contienen, además de cultivos específicos de yogur, *Lactobacillus acidophilus* y/o bifidobacterias (Bigliardi & Galati, 2013; Camaschella, Mignot, Pirovano-, & Sozzi, 1998; Gilliland, 1999; Illanes, 2015; Jensen, Grimmer, Naterstad, & Axelsson, 2012; Olagnero, Abad, & Bendersky, 2007; Organización Mundial de la Salud, 2011; Song, Ibrahim, & Hayek, 2012; Talwalkar & Kailasapathy, 2004; Tripathi & Giri, 2014). Estos microorganismos probióticos según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) de Naciones Unidas son: “Microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud” (FAO & OMS, 2006). Entre los requisitos para que un microorganismo sea considerado probiótico se encuentran: Evaluaciones *in vitro* necesarias para validar una cepa como potencialmente probiótica (que no sea patógeno, sea estable genética y fisiológicamente en su lugar de acción, además se debe considerar generalmente seguro (estatus GRAS) al ser consumido) e *in vivo* necesarios para atribuirle a dicha cepa su cualidad como probiótico (supervivencia en el paso por el tracto gastrointestinal (Kandylyis, Pissaridi, Bekatorou, Kanellaki, & Koutinas, 2016), comprobación científica de los beneficios en salud que confiere a su hospedero con estudios controlados en humanos) y uno de los aspectos más importantes es que debe administrarse en dosis adecuadas, e instalarse en el intestino para realizar un efecto benéfico (Caillard & Lapointe, 2017; Illanes, 2015). Es decir, que los microorganismos deben estar viables y disponibles en recuentos altos, por lo que se sugiere que la dosis terapéutica mínima por día sea entre 10^8 UFC/mL o g y 10^9 UFC/mL o g del probiótico dentro del producto en el momento del consumo (Kandylyis et al., 2016; Patrick, 2012). Según la normatividad colombiana se ha adoptado el nivel mínimo recomendado de 10^6 UFC/mL o g, criterio normativo emitido por el Ministerio de Protección Social en la Resolución 333 de 2011, como requisito mínimo de bacterias lácticas probióticas en leches cultivadas (Ministerio Protección, 2011). Esto debe verificarse para cada cepa potencialmente probiótica (Ashraf & Shah, 2011) en las industrias de alimentos durante todo el proceso productivo hasta el final de la vida útil (con variabilidad mínima de un lote a otro), utilizando instrumentos adecuados y calibrados, métodos de análisis documentados, patrones de referencia confiables y preservando la integridad de la muestra. De esta forma se garantizan reportes confiables sobre el estado del producto final.

Dado que los yogures se preparan a partir de diferentes cepas, requiere una enumeración selectiva de las diferentes especies microbianas que los componen (cultivos iniciadores y cultivos probióticos) y su correcta identificación se dificulta (Camaschella et al., 1998; Coeuret, Dubernet, Bernardeau, Gueguen, & Vernoux, 2003; Sutula, Coulthwaite, & Verran, 2012), pues son muy pocos los medios de cultivo disponibles que sean lo suficientemente selectivos para permitir el aislamiento de cepas probióticas de poblaciones mixtas como las que están presentes en el yogur (Sutula et al., 2012), y aunque existen estudios *in vivo* e *in vitro* sobre la actividad probiótica de microorganismos en diferentes matrices alimentarias (Hütt, Shchepetova, Lõivukene, Kullisaar, & Mikelsaar, 2006; Qualities, 2002; Salva et al., 2011; Salva, Merino, Agüero, Gruppi, & Alvarez, 2012; J Villena et al., 2012; Julio Villena et al., 2012; Wang et al., 2004), son pocos o nulos los trabajos publicados en Colombia sobre validaciones de metodologías confiables y con baja incertidumbre para la cuantificación de microorganismos probióticos en yogur (Senaka Ranadheera, Evans, Adams, & Baines, 2012), o si se realizan, éstas no son publicadas porque podrían revelar tanto fortalezas como debilidades y esto genera desconfianza a la hora de publicar los resultados obtenidos. Entre estos métodos de validación, algunos pueden generar resultados equivalentes a los suministrados por el correspondiente método de referencia, mientras que otros pueden producir resultados con diferencias apreciables (Fornés, 2008; Norma técnica colombiana. NTC 5014, 2001). En este sentido, mediante la validación el laboratorio demuestra la capacidad para reproducir los ensayos y/o pruebas que hace e indica que si en un ensayo se obtuvieron resultados objetivos, en las pruebas posteriores se obtendrán los mismos resultados con desviaciones aceptables y con las limitaciones que supone el uso de los mismos procedimientos, equipos y personas involucradas en la ejecución del análisis (Ordoñez Parra & Rojas Salazar, 2007). Esto ayudaría a las empresas a cumplir con las normas reglamentarias (nacionales e internacionales) y así garantizar la entrega de las concentraciones requeridas para obtener beneficios al consumidor. Por lo cual, dentro de la Cooperativa Colanta® se evaluó una metodología para el recuento del microorganismo probiótico *L. acidophilus* La3 en agar HHD (McDonald et al., 1987), siendo este un método alternativo que brinda una solución rápida al problema de diferenciación que se daba con el método de referencia (Agar MRS) en una matriz compleja como el Yogur Colanta®, se necesitó validarlo para dar resultados confiables en el reporte de probióticos en su producto final, pues si bien, existen artículos que relacionan el uso de este método aún no ha sido validado para utilizarlo en cepas y productos comerciales (Ashraf & Shah, 2011).

En el campo microbiológico y debido a las características propias de los métodos de ensayo, en general se había optado por la utilización de métodos publicados, para evitar el requisito de validación. En algún caso esto producía dificultades, ya que los métodos no eran seguidos estrictamente, por ejemplo, en cuanto a tolerancias de temperaturas, o composiciones de medios. Por otro lado, la información existente sobre características de los métodos, era escasa, y en el periodo 1990-2000, se empieza a poner de manifiesto, a través de ejercicios de intercomparación, que los resultados obtenidos pueden ser dependientes del método utilizado. Con la publicación de la norma ISO 17025 y la interpretación de la misma realizada por los organismos de acreditación, la validación de los métodos microbiológicos,

cobra un papel fundamental, ya que se solicita que se validen internamente también, aquellos métodos que no tienen parámetros definidos, de modo que una vez obtenidos éstos, puedan compararse con requisitos preestablecidos que demuestren su aptitud para el uso. En el último periodo se procede a la publicación de un importante número de normas ISO: ISO 13843, ISO 16140, ISO 17994 (Sánchez, 2005).

Los métodos alternativos son muy utilizados para el desarrollo de técnicas microbiológicas cuantitativas, estos corresponden a ensayos orientados a determinar los recuentos de microorganismos en una muestra determinada (Desempeño, 2015), por lo que deben ser validados para implementarlos en la rutina de análisis de muestras alimentarias, incluidos los alimentos funcionales. Por lo cual, como parte del control de calidad en las industrias que elaboran leches fermentadas tipo yogur como la Cooperativa Colanta®, es importante realizar ajustes en los procesos industriales cuando no se tengan valores acordes a los exigidos, y además realizar futuras investigaciones con alta confiabilidad, disminuyendo la variabilidad analítica, comparando lotes de productos con mayor confianza y seleccionando el mejor punto en la producción donde sea más confiable muestrear. Esta investigación sirve de herramienta para detectar otros tipos de microorganismos, que aumentarían la inocuidad de este alimento, mediante la validación de la metodología para la cuantificación confiable de las bacterias lácticas probióticas que se han añadido a la matriz. Errores en la proporción de los microorganismos probióticos o bien, en la cuantificación, dará como resultado productos terminados de baja calidad, los cuales no proporcionarán al consumidor el efecto benéfico propuesto, poniendo en riesgo la confianza de la marca en el mercado y acarreando probables demandas legales por publicidad engañosa lo que afectaría el buen nombre de la Cooperativa Colanta®.

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Validar una metodología para la cuantificación de un microorganismo probiótico (*Lactobacillus acidophilus* La3) en yogur.

1.2.3 Objetivos Específicos

- Evaluar los parámetros de desempeño del método microbiológico de recuento en placa en agar HHD para la cuantificación del microorganismo probiótico *L. acidophilus* La3 en yogur: Límite de detección (LOD), Límite de cuantificación (LOQ), Inclusividad,

Veracidad (Sesgo, recuperación) y Precisión (repetibilidad, precisión intermedia); y determinar la idoneidad del método para el uso previsto.

- Determinar la incertidumbre del método microbiológico de recuento en placa en agar HHD para la cuantificación del microorganismo probiótico *L. acidophilus* La3 en yogur.

2. MARCO TEÓRICO

Con el fin de brindar una mayor calidad a los consumidores, las empresas productoras de alimentos deben realizar análisis microbiológicos y fisicoquímicos, para determinar la confiabilidad del producto y verificar si aprueban los niveles de calidad exigidos para que dichos productos puedan ser comercializados. Por esta razón, es necesario que los laboratorios que llevan a cabo dichos análisis tengan como objetivo principal proporcionar resultados altamente confiables, razón por la cual, el laboratorio debe controlar y asegurar la calidad de sus resultados, lo cual radica principalmente en la alineación con parámetros nacionales e internacionales, para así poder garantizar un buen desarrollo del procedimiento y que éste se realice en forma correcta cada vez que se ejecute, y esto se logra mediante la implementación de la validación de las técnicas utilizadas en el laboratorio (Padilla, 2007).

Es así como la utilización de métodos de detección de microorganismos en alimentos es una de las herramientas utilizadas para garantizar la seguridad microbiológica de los productos. Pero, ¿cómo garantizar resultados confiables? La respuesta está en la validación de la metodología utilizada. Según *Freitas, E.I. et al 2006* (Lemos, Marin, As, Origem, & Doa, n.d.), la validación es un acto documentado que atestigua que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, operación o sistema realmente lleve a los resultados esperados.

2.1 Validación

Antes de que un procedimiento pueda proporcionar información analítica útil, es necesario demostrar que sus resultados son aceptables. La validación consiste en valorar si la precisión y la exactitud que se obtienen siguiendo el procedimiento son adecuadas para el problema. Además, la validación garantiza que el procedimiento escrito es lo suficientemente detallado como para que distintos analistas o laboratorios obtengan resultados comparables cuando lo utilicen (OAA, 2013).

La validación de los diversos métodos analíticos, en concordancia con lo expresado en la ISO NTC/IEC 17025 (Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración) consiste en confirmar, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto (Ariza Tirado, 2015).

2.1.1. Métodos Analíticos

Los métodos analíticos pueden ser comprendidos como los recursos elementales usados en un laboratorio, con los cuales se busca determinar la presencia o la cantidad esperada de un analito de interés particular sobre una matriz específica en condiciones establecidas previamente. Además, para que la identificación y/o cuantificación del analito

de interés sea válida, es imprescindible que dicho método se encuentre reconocido antes de su implementación, ya sea por que sigue los lineamientos de la normativa internacional o por que se ha desarrollado todo un proceso de validación, por lo cual es prioritario que el laboratorio defina los estándares de calidad de la metodología analítica para poder garantizar la fiabilidad o confiabilidad de las medidas y de los resultados obtenidos (Ariza Tirado, 2015).

También resulta pertinente considerar que en algunos sectores productivos, y en particular en el sector de los alimentos, es notable la necesidad de utilizar métodos de análisis cuantitativos “totalmente validados” para la determinación de los diversos parámetros o indicadores de calidad, puesto que se requiere contar con la capacidad de obtener datos oportunos y confiables que representen a la sociedad la garantía de que los productos ofrecidos, corresponden a los estándares de excelencia normalizados para el sector agroalimentario.

Para definir el alcance de la validación se tendrá en cuenta el tipo de ensayo; del cual dependerá los atributos y especificidad del protocolo de validación:

Método Normalizado o de Referencia

Es un método estandarizado, internacionalmente reconocido y de amplia aceptación, validado por otro organismo, que ha sido publicado, generalmente por comunidades científicas y que se aplica exactamente como está descrito en la norma.

Método No Normalizado

Se trata de una modificación a un método de ensayo normalizado, por ejemplo, se hicieron modificaciones a los métodos descritos en la norma que pueden tener una repercusión sobre la calidad de los resultados.

Método alternativo

Es un método de análisis que demuestra o estima, para una categoría dada de productos, el mismo analito que se mide con el correspondiente método de referencia (Norma técnica colombiana. NTC 5014, 2001). El método puede ser patentado o no comercial y no se necesita que cubra un procedimiento completo de análisis, es decir, desde la preparación de muestras hasta el informe de ensayo. Se caracteriza por ser rápido y fácil de usar. Sin embargo, este método debe ser validado por organismos especializados o bajo normas internacionalmente reconocidas como la norma ISO 16140 (Veterinarias, 2015).

Para la recuperación e identificación microbiana, los laboratorios de pruebas microbiológicas a veces usan métodos de prueba alternativos a los descritos en las normas generales por las razones descritas antes que incluyen la economía, el rendimiento y la conveniencia (Convention, 2007). Con la validación, se determinan las posibles variaciones que se presentan entre diferentes números de ensayos y de esta manera disminuir posibilidades de error dentro del método, generando un alto grado de confianza en los resultados finales arrojados por el sistema validado (Tijerina Rodríguez Laura Esther, 2014).

2.2 Validación de un método alterno

Para realizar la validación, se debe considerar si el método alternativo dará o no resultados equivalentes o mejores que los resultados generados por el método convencional. En caso de una disputa, solo el resultado obtenido por la prueba del método de referencia será concluyente (Convention, 2007).

Los estudios de validación de métodos microbiológicos alternativos deben tener en cuenta un mayor grado de variabilidad. Por ejemplo, cuando se realizan pruebas microbiológicas mediante el recuento de placas convencionales, se encuentra un rango de resultados que es más amplio (desviación estándar relativa (%RSD) de 15 a 35) que los rangos en los ensayos químicos comúnmente usados (%RSD de 1 a 3). Muchos métodos microbiológicos convencionales están sujetos a errores de muestreo, dilución, placas, incubación y errores del operador (Convention, 2007).

Otras organizaciones de la industria han proporcionado orientación para la validación de métodos microbiológicos alternativos (Microbiological & Validation, 2018), el de la Farmacopea de Estados Unidos (siglas en inglés United States Pharmacopeia, USP) se detalla a continuación.

Tipos de pruebas microbiológicas

Hay tres tipos principales de determinaciones específicas para pruebas microbiológicas. Estas incluyen pruebas para determinar si los microorganismos están presentes en una muestra, pruebas para cuantificar el número de microorganismos (o para enumerar una subpoblación específica de la muestra) y pruebas diseñadas para identificar microorganismos (Convention, 2007; Microbiological & Validation, 2018). Como la identificación microbiana no está en el alcance de esta validación, no se tratará este tema.

- Pruebas cualitativas para la presencia o ausencia de microorganismos

Este tipo de prueba se caracteriza por el uso de turbidez en un medio de crecimiento líquido, como evidencia de la presencia de microorganismos viables en la muestra de prueba (El ejemplo más común de esta prueba, es la prueba de esterilidad). Otros ejemplos de este tipo de pruebas, son aquellas pruebas diseñadas para evaluar la presencia o ausencia de un tipo particular de microorganismo en una muestra (por ejemplo, Coliformes en agua potable y *Listeria monocytogenes* en alimentos).

- Pruebas cuantitativas para microorganismos

El método de recuento en placa, es el ejemplo más común de esta clase de pruebas utilizadas para estimar el número de microorganismos viables presentes en una muestra. La filtración por membrana y los métodos de tubos múltiples de Número más probable (NMP) son otros ejemplos de estas pruebas. Este último se desarrolló como un medio para estimar el número de microorganismos viables presentes en una muestra, que no es susceptible de siembra directa o filtración por membrana.

Los métodos que caen dentro de las tres categorías descritas, tienen un grado de variabilidad, y con estas variaciones los métodos microbiológicos son intrínsecamente diferentes de los analíticos. La razón de la variación, es porque la microbiología es una ciencia logarítmica, pues los métodos microbiológicos son capaces de distinguir entre 100 y 1000 células (1 log), pero no diferencias menores, como 0.3 o 0.5 de un logaritmo. Esto significa que 18 unidades formadoras de colonias (ufc) no son técnicamente diferentes de 10 ufc; y 1 ufc es diferente de 10 ufc pero no de 5 ufc.

Por lo tanto, los métodos basados en cultivos, en particular, proporcionan estimaciones en lugar de recuentos exactos de células. La variabilidad puede dar lugar a dificultades para comparar dos métodos. En general, solo se puede lograr una comparación del 50% para los métodos de cultivo. Con métodos microbiológicos rápidos y alternativos se puede lograr una mayor comparabilidad, sin embargo, los niveles de precisión permanecen en el orden de 15 a 35% de desviación estándar relativa (Microbiological & Validation, 2018).

- Consideraciones generales

Dado que las pruebas cuantitativas, por su naturaleza producen datos numéricos, permiten el uso de técnicas estadísticas paramétricas. Al contrario, las valoraciones microbiológicas cualitativas, como la prueba de esterilidad del ejemplo anterior, pueden requerir análisis por métodos estadísticos no paramétricos. La validación de métodos microbiológicos comparte algunas de las mismas consideraciones, aunque se debe tener en cuenta la naturaleza peculiar de las valoraciones microbiológicas (Ver Tabla 1) (Convention, 2007).

Tabla 1. Parámetros de validación por tipo de prueba microbiológica

Parámetro	Pruebas cualitativas	Pruebas cuantitativas
Exactitud	No	Sí
Precisión	No	Sí
Especificidad	Sí	Sí
Límite de detección	Sí	Sí
Límite de cuantificación	No	Sí
Linealidad	No	Sí
Intervalo operativo	No	Sí
Repetibilidad	Sí	Sí

2.2.1 Técnicas para la validación

Para la validación es conveniente utilizar una o varias de las siguientes técnicas para la determinación del desempeño de un método:

1) Contaminación de muestras artificialmente: La validación de métodos microbiológicos debe ser reflejo de las condiciones de ensayo reales. Esto se puede conseguir utilizando muestras contaminadas naturalmente, o muestras contaminadas o fortificadas a un determinado nivel. En general, el proceso consiste en la preparación de una muestra agregando el material interferente a una muestra real que contenga el material a ensayar. Una segunda alícuota de la muestra original se diluye con un solvente, y ambas se analizan determinándose la diferencia entre ambas.

2) Uso de materiales de referencia o materiales de referencia 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.

3) Comparación de resultados obtenidos con otros métodos alternativos: Se analizan muestras 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, en la medida de lo posible, el de referencia (gold standard).

4) Comparaciones interlaboratorios (validación por pares de valores): La validación por pares de valores, es aplicable cuando no es posible utilizar ninguno de los métodos anteriores, es decir, no es posible realizar contaminación artificial de las muestras, no se puede disponer de muestras de valor de referencia estable, o aún cuando se tengan no se disponga de cantidad suficiente. Esta sistemática se basa en la utilización de resultados de intercomparaciones en las que haya participado el laboratorio, y utilizar estos datos como valores de referencia.

La participación en intercomparaciones, permite una evaluación del sesgo de forma que el laboratorio pueda demostrar que se mantiene dentro de los criterios de aceptación definidos por normas, reglamentos, por el cliente o por el laboratorio.

2.2.2 Parámetros de validación

La validación de los métodos alternos precisa un protocolo confiable que sea común a los proveedores/productores de los métodos mismos, a la industria alimentaria, a las autoridades de servicios de salud pública y otras autoridades. Los datos generados pueden también ser la base para que una organización independiente certifique un método (Norma técnica colombiana. NTC 5014, 2001).

Linealidad

La linealidad de una prueba microbiológica cuantitativa, es su capacidad para generar resultados que sean proporcionales a la concentración de microorganismos presentes en la muestra, dentro de un intervalo dado. La linealidad debería determinarse en el intervalo de la prueba. Un método para su determinación, consiste en seleccionar por lo menos 5 concentraciones de cada microorganismo de desafío estándar, y llevar a cabo por lo menos 5 lecturas repetidas de cada concentración. Una medida adecuada sería calcular el cuadrado del coeficiente de correlación, R^2 , a partir de un análisis de regresión lineal de los datos generados previamente. Aunque el coeficiente de correlación no provee una estimación de la linealidad, es una medida conveniente y usualmente aplicada para aproximar la relación. El método alternativo no debería tener un valor R^2 menor de 0,95 (Convention, 2007).

Límite de detección (LOD)

Es la menor magnitud que puede examinarse de un analito (por ejemplo, microorganismo, etc.), que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y

precisión. Es la concentración real más baja de analito en una muestra que puede ser detectado consistentemente (por ejemplo, en el 95% de los especímenes probados), con una precisión aceptable, pero no necesariamente cuantificado, en condiciones de laboratorio de rutina y en un tipo de muestra definida. En el caso de los cultivos microbiológicos es el número mínimo de organismos que pueden ser detectados en una cantidad de muestra con una probabilidad dada, pero en cantidades que no pueden ser claramente cuantificadas. Se establece determinando una muestra o material de referencia apropiado. Se aplica generalmente a métodos cualitativos (Camaró-sala et al., 2015).

Límite de cuantificación o determinación (LOQ)

Se define como la cantidad más pequeña de analito (es decir, el número real y más bajo de organismo) que puede medirse y cuantificarse con precisión y exactitud definidas, bajo las condiciones experimentales y con el método que está siendo validado (Norma técnica colombiana. NTC 5014, 2001).

Especificidad

Es el grado en que se ve afectado un método (o no), por los otros componentes presentes en una muestra multi-componente. Esto es la capacidad de un método para medir exactamente un analito dado, o su cantidad, dentro de la muestra sin interferencia de componentes no blanco como un efecto matriz o el ruido de fondo (Norma técnica colombiana. NTC 5014, 2001).

Inclusividad

Es la capacidad de detección de un analito objetivo entre una amplia gama de cepas. La elección de las cepas de inclusión debe cubrir la diversidad genética, serológica, bioquímica o física de los grupos de agentes objetivo, según sea apropiado para el método. El número de organismos necesarios para la validación, estará determinado por la diversidad de los grupos de agentes objetivo y la reclamación de uso previsto. El número de cepas analizadas no debe ser inferior a 50 para cada especie objetivo, si está disponible. Para los métodos de *Salmonella*, el número de organismos objetivo aumenta a al menos 100 serovares que se seleccionan para representar la mayoría de los grupos somáticos conocidos de *Salmonella* (AOAC, 2012).

Exclusividad

Es la falta de interferencia entre un rango relevante de cepas no objetivo, del método alternativo. La elección de las cepas de exclusividad debe incluir organismos no reivindicados por el método de identificación confirmatoria. La elección de cepas de exclusividad debe reflejar organismos estrechamente relacionados y potencialmente competitivos. Se deben considerar otros factores como la virulencia, la frecuencia de aparición y la disponibilidad. El número de especies/cepas analizadas no debe ser inferior a 30 (AOAC, 2012).

Precisión

Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento analítico repetidas veces, bajo condiciones establecidas. La precisión depende solo de la distribución de errores aleatorios y no tiene ninguna relación con el valor verdadero o el valor especificado. Se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Independientemente de los resultados específicos, el método alternativo debería tener un coeficiente de variación que no sea mayor que el del método tradicional (Convention, 2007). Por ejemplo, un método de recuento en placa podría tener intervalos de desviación estándar relativa como los que aparecen en la siguiente tabla.

Tabla 2. Desviación estándar relativa esperada en función de ufc por placa (Convention, 2007)

ufc por Placa	Desviación estándar relativa esperada
30-300	<15%
10-30	<25%
<10	<35%

Si los resultados son obtenidos con el mismo método, con idéntico material de ensayo y bajo las mismas condiciones (equipo, operador, laboratorio) en intervalos cortos de tiempo, se habla de Repetibilidad. Por otro lado, si los resultados son obtenidos con el mismo procedimiento de medición, el mismo lugar y mediciones repetidas del mismo objeto u objetos similares durante un periodo amplio de tiempo, pero que puede incluir otras condiciones que involucren variaciones, se habla de Precisión intermedia. Finalmente, si los

resultados son obtenidos de pruebas únicas con idéntico material de ensayo, uso del mismo método y por operadores en diferentes laboratorios con equipos diferentes, se habla de Reproducibilidad (Norma técnica colombiana. NTC 5014, 2001).

Veracidad

Determina el grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. Su estudio implica disponer de un material de referencia frente al que comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos por aplicación del método del laboratorio y el valor de referencia (Camaró-sala et al., 2015).

Recuperación

Es la fracción de la sustancia agregada a la muestra (muestra fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar. Una muestra fortificada es una solución, en la que el analito ha sido adicionado a valores conocidos.

Muchas variables pueden afectar la recuperación, éstas incluyen: Medios de crecimiento; las unidades formadoras de colonias o "ufc" no es un conteo de células verdadero (las células individuales son raras en su naturaleza, lo que lleva a que la ufc sea una subestimación de la cantidad de microorganismos presentes); condiciones de incubación (temperatura y tiempo); requerimiento nutricional del organismo; condición física del organismo (daño estresado o subletal debido a la temperatura, humedad, alta fuerza iónica, pH extremo, choque osmótico (en relación con el líquido); residuos de productos químicos antimicrobianos); errores de dilución; es poco probable que se recuperen los organismos ambientales cuando se encuentran en la fase de crecimiento exponencial (el crecimiento exponencial conduce a una mejor recuperación); característica del artículo bajo prueba y los tipos de neutralizadores utilizados (Microbiological & Validation, 2018).

Sesgo

Es la diferencia entre las expectativas de los resultados de prueba y un valor de referencia aceptado (Camaró-sala et al., 2015).

2.3 Incertidumbre

La incertidumbre asociada a las mediciones realizadas en los laboratorios de ensayo, debe estar definida para los diferentes tipos de determinaciones, con el objetivo de poder estimar en forma más exacta la proximidad del valor obtenido con el valor esperado y con el valor teórico o real del analito.

Antes de empezar a determinar la incertidumbre de una técnica, de un equipo o de un instrumento se requiere contar con un método del ensayo que se encuentre validado y verificado, o sea, que se debe conocer cuál es el comportamiento de los datos obtenidos en términos de: exactitud, precisión, sensibilidad, selectividad, rango de linealidad, varianza, coeficiente de variación, repetibilidad, reproducibilidad y robustez, para poder garantizar que los resultados obtenidos por el método aplicado son absolutamente confiables (Ariza Tirado, 2015).

Tipos de incertidumbre

Incertidumbre estándar (u)

Es la incertidumbre del resultado de una medición expresada como desviación estándar.

Incertidumbre estándar combinada (u_c)

Es la incertidumbre estándar del resultado de una medición cuando ese resultado se obtiene de los valores de una cantidad de otras cantidades, igual a la raíz cuadrada positiva de una suma de términos, los términos son las varianzas o covarianzas de estas otras cantidades ponderadas según cómo el resultado de la medición varía con los cambios en estas cantidades.

Incertidumbre expandida (U)

Es la cantidad que define un intervalo sobre el resultado de una medición que se puede esperar que abarque una gran fracción de la distribución de valores que razonablemente podría atribuirse al mensurando (Specification, 2006).

Cuantificación de la incertidumbre

Tipo A

Evaluación estadística de la incertidumbre estándar. Se estima una desviación estándar, la cual se obtiene estadísticamente utilizando mediciones repetidas, actuales o previas.

Condiciones de repetibilidad, condiciones de precisión intermedia y condiciones de reproducibilidad.

Tipo B

Evaluación no estadística de la incertidumbre estándar. Se utiliza toda la información disponible para calcular la variabilidad de cada fuente de incertidumbre.

Evaluación basada en informaciones: Asociadas al valor de un material de referencia certificado, obtenidas a partir de un certificado de calibración, obtenidas a partir de la clase de exactitud de un instrumento de medida verificado, obtenidas a partir de los límites procedentes de la experiencia personal.

2.4 Pruebas de significancia

La validación requiere el empleo de la estadística como una herramienta que aporta evidencia concreta de las tendencias en los resultados que se obtienen, para que así el analista esté en capacidad de conseguir datos confiables con técnicas de análisis validadas afrontando preguntas cómo: ¿el método es exacto?, ¿el método es preciso?, ¿el método es robusto?, ¿el método es reproducible?, ¿existen datos anómalos? entre otras. Con base en los anteriores interrogantes es posible que el analista emita juicios reales, dejando a un lado el sesgo personal, y tome decisiones de las modificaciones o mejoras que requiera el método en particular según las exigencias establecidas por la normativa y por los clientes externos y/o internos del laboratorio (Ariza Tirado, 2015).

Test de significancia

Un test de significancia se crea para determinar si la diferencia entre dos o mas valores es demasiado grande como para que pueda explicarse por un error aleatorio. Al crear una

prueba de significancia, el primer paso consiste en definir el problema experimental como una cuestión de si o no. Una hipótesis nula y una hipótesis alternativa proporcionan respuestas a la pregunta. La hipótesis nula, H_0 implica que el error aleatorio es suficiente para explicar cualquier diferencia entre los valores que se comparan. La hipótesis alternativa, H_a , es que la diferencia entre los valores es demasiado grande como para que pueda ser explicada por un error aleatorio y por tanto, debe ser real. La prueba de significancia se lleva a cabo sobre la hipótesis nula que, tras la prueba, se acepta o se rechaza. Si la hipótesis nula se rechaza, deberá aceptarse la hipótesis alternativa. Cuando la hipótesis nula no se rechaza, se dice que se acepta.

Una vez establecidas la hipótesis nula y alternativa, se elige un nivel de significación para el análisis. El nivel de significación es el nivel de confianza para la retención de la hipótesis nula, o, en otras palabras, la probabilidad de que el rechazo de la hipótesis nula sea incorrecto (OAA, 2013).

Dentro de un proceso de validación se debe especificar los requisitos y condiciones a cumplir, determinar los parámetros de desempeño del método, establecer el diseño experimental y el método de análisis de resultados (OAA, 2013), por lo que es fundamental definir su alcance, especificar la matriz o matrices a estudiar; establecer condiciones tales como temperatura y tiempo de incubación, límites de operación; realizar una clara descripción del/los microorganismos de interés. Si los parámetros de desempeño no están ya especificados, el laboratorio que pretende realizar la validación decidirá cuáles deben ser caracterizados con el fin de validar el método, lo cual deberá estar fundamentado de manera confiable y científica (OAA, 2013).

2.5 Microorganismos probióticos

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) de Naciones Unidas son: “Microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud”(Douglas & Sanders, 2008).

En general, la mayoría de los probióticos son bacilos gram-positivos, usualmente catalasa-negativa, con extremos redondeados, y se agrupan en cadenas cortas o cadenas largas. No son flagelados, no son móviles y no forman esporas, y son intolerantes a la sal. La temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de los probióticos es 37°C, y el pH óptimo para el crecimiento inicial es de 6,5-7,0. *Lactobacillus acidophilus* es microaerofílico con preferencia anaeróbica y capacidad de crecimiento aeróbico. Además, los probióticos producen una variedad de compuestos beneficiosos tales como antimicrobianos, ácido láctico, peróxido de hidrógeno, y una variedad de bacteriocinas. Los probióticos deben tener la capacidad de interactuar con la microflora del huésped y patógenos microbianos, bacterianos, virales y fúngicos (Song et al., 2012).

Los probióticos están destinados a ayudar al equilibrio de la microbiota intestinal natural del cuerpo, lo que es de gran importancia para el mantenimiento de la salud (Jankovic et al., 2010).

En el estudio reportado por Jankovic I, et al. 2010 (Jankovic et al., 2010) indicaron la necesidad de proporcionar una dosis apropiada de bacterias probióticas para obtener los efectos deseados. El nivel de dosis (Douglas & Sanders, 2008) y la viabilidad del probiótico, deben mantenerse a lo largo del almacenamiento y durante toda la vida útil del producto. Por lo tanto, el suministro de probióticos en una matriz alimentaria adecuada es uno de los medios más apropiados para maximizar la eficacia probiótica (Olagnero et al., 2007; Ranadheera, Evans, Adams, & Baines, 2012). Por lo que las proteínas de la leche proporcionan además, una protección importante a las bacterias probióticas durante el paso a través del estómago (Gilliland, 1999).

Una de las matrices alimentarias más comunes que contienen probióticos es el yogur (Ashraf & Shah, 2011), el cual según la Resolución Número 02310 de 1986 del Ministerio de Salud de Colombia (Ministerio de la Protección Social, 2009), se obtiene a partir de leche higienizada, coagulada por la acción de cultivos iniciadores específicos (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), para obtener las características propias de aroma, cuerpo, textura y sabor. Así mismo, el yogur contiene cultivos probióticos, tipo *Lactobacillus acidophilus* que consumidos habitualmente y junto a una dieta balanceada, pueden ayudar a normalizar las funciones digestivas y regenerar la microbiota intestinal (Jankovic et al., 2010; Wohlgemuth, Loh, & Blaut, 2010). Estos microorganismos poseen una actividad antimicrobiana, que inhibe patógenos a partir de la producción de bacteriocinas (péptidos antimicrobianos) y distintos ácidos orgánicos (Caillard & Lapointe, 2017; Illanes, 2015; Jankovic et al., 2010), además de estar asociados con una posible disminución en la colesterolemia (Illanes, 2015; Jankovic et al., 2010; Tripathi & Giri, 2014), y del riesgo de cáncer de colon (Illanes, 2015; Rojas-Castro, Chacón-Villalobos, & Pineda-Castro, 2007). Tanto los microorganismos iniciadores como los probióticos involucrados en la producción del yogur, deben ser abundantes y viables en el producto final. Desde la industria alimentaria en general se ha adoptado el nivel mínimo recomendado de 10^6 ufc/ml o g, criterio normativo emitido por el Ministerio de Protección Social en la Resolución 333 del 2011 como requisito mínimo de bacterias lácticas probióticas (Senaka Ranadheera et al., 2012; Tripathi & Giri, 2014).

Vasiljevic Ty Shah NP, 2008 (Vasiljevic & Shah, 2008) determinaron que ciertas cepas aisladas de *L. acidophilus* fueron capaces de colonizar en el tracto digestivo donde ejercían una apreciable actividad probiótica. Un grupo de expertos FAO/OMS (2001) sugirió que la especificidad de la acción probiótica es más importante que la fuente del microorganismo. *L. acidophilus* tiene una gran capacidad de amortiguación citoplasmática (pH 3,72~7,74), lo que le permite resistir los cambios en el pH citoplasmático y la estabilidad de ganancia en condiciones ácidas. Por lo tanto, es más tolerante a condiciones ácidas que *Bifidobacterium* spp (Talwalkar & Kailasapathy, 2004).

Aunque existen estudios *in vivo* e *in vitro* sobre la actividad probiótica de microorganismos en diferentes matrices alimentarias (Hütt et al., 2006; Qualities, 2002; Salva et al., 2011, 2012; J Villena et al., 2012; Julio Villena et al., 2012; Wang et al., 2004) son pocos los trabajos publicados sobre la validación de una metodología confiable y con baja incertidumbre para la cuantificación del microorganismo probiótico *L. acidophilus* en yogur que ayude a las empresas a cumplir con las normas reglamentarias y así garantizar la entrega de los beneficios terapéuticos al consumidor (Senaka Ranadheera et al., 2012).

2.6 Método para el recuento de bacterias probióticas

El método de referencia emplea el Agar MRS descrito en la NTC 5034:2002 para recuento y enumeración de bacterias mesofílicas de ácido láctico (Norma técnica colombiana. NTC 5034, 2002), pero éste no permite una diferenciación entre los microorganismos probióticos y los cultivos iniciadores que hacen parte del yogur. Por lo que el medio de cultivo diferenciador de heterofermentadores y homofermentadores (HHD), surge como una buena alternativa para el problema que se tiene con el método de referencia. El agar HHD es un medio de cultivo diferencial que permite la comprobación de una o más características fisicoquímicas o bioquímicas de los microorganismos para su identificación (International Organization for Standardization, 2003), por contener un indicador de pH que ayuda a diferenciar visualmente los microorganismos heterofermentadores de los homofermentadores pertenecientes al grupo de bacterias ácido lácticas (BAL), que en su mayoría componen la matrices lácteas como el yogur. La diferenciación de especies se basa en el uso de una cantidad limitada de fructosa, como la única fuente de carbohidratos, y en el verde de bromocresol como un indicador de pH. Este indicador facilita la diferenciación de estos dos grupos de BAL, actuando como índice de una mayor producción de ácido por unidad de peso de fructosa.

Las bacterias del ácido láctico característicamente carecen de citocromos y dependen de la fosforilación a nivel de sustrato durante la fermentación del azúcar para obtener energía. Se subdividen en función de sus vías y productos de la fermentación del azúcar. Las BAL homofermentativas utilizan la vía de Embden-Meyerhof-Warburg-Parnas (EMWP) para generar lactato como el único producto de la fermentación, mientras que las BAL heterofermentativas usan la vía de pentosa fosfoquinasa (PKP) para producir una mezcla de CO₂, etanol, acetato y lactato. Las BAL que utilizan la vía de EMWP generalmente tienen sistemas de fosfotransferasa que transportan azúcar dependiente de fosfoenolpiruvato (PEPPTS), mientras que aquellos que utilizan el PKP no (Charteris, Kelly, Morelli, & Collins, 1997). Las especies homofermentativas producen ácido láctico (<85%) como único producto final, mientras que las especies heterofermentativas producen ácido láctico, CO₂ y etanol/acetato (Axelsson & Ahrné, 2000; Murphy, 2009). En el agar HHD, las bacterias heterofermentativas reducen una porción de fructosa al manitol además de producir CO₂, ácido láctico y ácido acético, cuando la fructosa es la única fuente de carbohidratos. Por otro

lado, las bacterias homofermentativas producen 2 moles de ácido láctico a partir de cualquier hexosa fermentable, incluida la fructosa (McDonald et al., 1987). Esto hace posible la diferenciación en la misma placa de las cepas probióticas y de los cultivos iniciadores (Camaschella et al., 1998).

3. METODOLOGÍA

La validación es un proceso de evaluación de las características de un procedimiento de medida, y comprobación de que dichas características cumplen una serie de requisitos pre-establecidos para el uso específico previsto (Asociación, Cárnicas, & López, 2013). Para este fin, se tuvo en cuenta la metodología para validación ISO 16140-2:2016 “Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia” (Iso, 2017).

3.1 Manejo de cepas y Técnica analítica

Para garantizar que cada montaje, tratamiento y unidad experimental contengan el mismo tipo de microorganismo y no afecte los resultados que se obtengan en cada etapa de este proceso, se trabajó con una cepa de referencia cualitativa *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 Kwik-stik™ Lote 885-40-9 pase 2 del proveedor Microbiologics®. Este se tomó como material de referencia certificado.

De igual forma se seleccionó el lote de cultivo del proveedor CSL (SACCO®), que es adicionado como probiótico en el yogur Colanta®, el cual se encuentra bajo las siguientes condiciones: polvo liofilizado que contiene células viables de la cepa de *L. acidophilus* La3 con una cantidad determinada (10^{11} a 10^{12} UFC/4 dosis), descrita en el certificado de calidad que viene con cada lote. Debido a esto se separó el lote E007415A y se dispuso en alícuotas de 10g y fue almacenado a -20°C , hasta la terminación del proyecto.

3.2. Técnica analítica

A continuación, se describen la técnica usada para el desarrollo de la investigación, los equipos, insumos y reactivos.

3.2.1. Recuento en placa

1. Se diluyen en 90 mL de agua triptona sal (al 0.1%) 10g de la muestra, así obtendrá la dilución 1:10.
2. Se toma con una pipeta electrónica 0.9 mL de agua triptona sal, luego se aspira 0.1 mL de la muestra a analizar (Concentración de 10^n), se dispensa esta dilución en un tubo seco estéril, y se repite este procedimiento hasta alcanzar la dilución deseada.

3. Se adiciona al agar HHD (ver preparación en numeral 3.2.2.2) y/o agar Man Rogosa y Sharpe MRS (Merck®) 0.1 mL de la dilución realizada, y se distribuye el inóculo con la espátula en forma de L de Drigalsky estéril por toda la superficie del medio.

4. Se incuba la caja invertida a una temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 ± 3 horas, en una jarra de anaerobiosis, con el Anaerogen® (OXOID) y la tirilla indicadora de anaerobiosis (Merck®).

5. Verificar la pureza y compatibilidad de las características microscópicas de las colonias mediante la coloración de GRAM.

6. Verificar la morfología macroscópica y microscópica de las colonias obtenidas versus las colonias de la cepa de referencia.

7. Seleccionar las placas de Petri que contengan entre 20 y 200 colonias.

8. Contar todas las colonias definidas con la ayuda del microscopio estereoscópico.

9. Reportar el resultado calculando el número N de bacterias *L. acidophilus* presentes en la muestra de ensayo, como la media ponderada de las dos diluciones sucesivas, empleando la ecuación (NTC 4092:2009): (Norma técnica colombiana. NTC 4092, 2009)

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Dónde:

$\sum C$ = es la suma de las colonias contadas en todas las cajas a partir de las dos diluciones sucesivas, de las cuales mínimo una contiene al menos 20 colonias;

V = es el volumen del inóculo aplicado a cada caja, en mililitros;

n_1 = es el número de cajas seleccionadas en la primera dilución;

n_2 = es el número de cajas seleccionadas en la segunda dilución;

d = es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución retenida.

Se redondean los resultados a dos cifras decimales, si la tercera cifra es inferior a 5, no se modifica la cifra precedente; si la tercera cifra es superior o igual a 5, incrementar la cifra precedente en una unidad.

Se expresa el resultado preferiblemente como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por la potencia correspondiente de 10, o un número entero con dos cifras decimales.

Ejemplo: El recuento ha producido los siguientes resultados:

- En la primera dilución (10^{-3}): 14 y 25 colonias
- En la segunda dilución (10^{-2}): 168 y 215 colonias

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1x(2 + 0,1x(2))x10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19168$$

Aproximando el resultado tal como se especificó antes, la cantidad de microorganismos probióticos *L. acidophilus* es 19.000 o $1,9 \times 10^4$ por mililitros o por gramo de producto.

Nota: Tener presente que el factor de dilución en siembra en superficie es 1/100 y por lo tanto al inverso de la dilución en la que se obtuvo recuento se debe agregar un cero para completar la unidad del 0.1 mL sembrado.

10. Registrar los resultados obtenidos en la bitácora destinada para ello.

Por otra parte, existen dos métodos para validaciones microbiológicas: Referencia y Alternativo. El de referencia es un método internacionalmente reconocido y de amplia aceptación. Luego se tiene el método alternativo, que es un método de análisis que demuestra o estima, para una categoría dada de productos, el mismo analito que se mide con el correspondiente método de referencia (Iso, 2017).

3.2.2 Generalidades del método alternativo

El método de referencia emplea el Agar MRS descrito en la NTC 5034:2002 para recuento y enumeración de bacterias mesófilas de ácido láctico (Norma técnica colombiana. NTC 5034, 2002). El método alternativo a utilizar es el agar diferenciador de homofermentadores y heterofermentadores (HHD), que se describe a continuación.

3.2.2.1 Principio

El recuento y la diferenciación de las bacterias ácido lácticas (BAL) homofermentativas de las heterofermentativas se logra, debido a que la placa de agar HHD contiene un indicador de pH (verde de bromocresol) que permite el viraje del color del medio de cultivo, facilitando visualmente la diferenciación de estos dos tipos de BAL. El medio permanece de color azul cuando hay crecimiento de los microorganismos heterofermentativos y cambia a color verde cuando hay crecimiento de los homofermentativos (McDonald et al., 1987).

3.2.2.2 Formulación

El medio de cultivo diferencial para heterofermentadores y homofermentadores (HHD) está compuesto por: 2.5g/L Fructosa, 2.5g/L KH_2PO_4 , 10g/L Peptona triptica, 1.5g/L Peptona fitona, 6g/L Ácido casamino, 10g/L Extracto de levadura (**), 20 mL Verde de bromocresol(*) y 20g/L de Agar. El pH se deberá ajustar a 7.0 ± 0.02 y autoclavar a 15lb de presión por 15 minutos.

(*) Solución stock: 0.1g de verde de bromocresol en 30 mL de NaOH al 0.01N.

(**) Se modifica la cantidad de extracto de levadura que plantea el autor McDonald.

3.2.2.3 Condición del método

Método no normalizado que se utilizará en la matriz del yogur para el recuento de unidades formadoras de colonia de bacterias probióticas en yogur Colanta® con un rango de lectura de 20 a 200 UFC/mL o g. La incubación se realizará en anaerobiosis a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 ± 3 horas (McDonald et al., 1987).

3.2.3 Insumos y Reactivos

- Cepas de trabajo:
 - Cepa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314
 - Cepa de *Lactobacillus acidophilus* La3 (CSL-SACCO®)
- Diluyente Agua triptona sal 0.1% (Biomérieux®)
- Diluyente Peptona universal (Merck®)
- Puntas estériles
- Tubos estériles para dilución
- Espátula en forma de L de Drigalsky estéril
- Agar HHD
- Agar MRS Merck®
- Vortex (Vodeco®)
- Anaerogen® (OXOID)
- Tirilla indicadora de anaerobiosis (Merck®).
- Jarra de anaerobiosis

3.3. Selección de parámetros

Para la selección de los parámetros analizados se tuvo en cuenta:

- Las características de las muestras de yogur (matriz compleja con cultivos iniciadores para dar viscosidad, textura y sabor al producto, y cultivos probióticos).
- Matriz utilizada: Yagur Colanta ® Lotes: 2857028002, 3137026901 y 3537020501.
- La estabilidad de la técnica implementada (recuperación y diferenciación del microorganismo buscado).
- La necesidad de los clientes (cumplimiento de la dosis mínima de probióticos).

Los parámetros a evaluar según la ISO 16140-2: 2016 serán:

- Límites de detección y cuantificación
- Linealidad
- Inclusividad (No se evaluó exclusividad ni especificidad porque el método es diferencial no selectivo).
- Precisión: expresados en repetibilidad y precisión intermedia
- Exactitud: evaluada según la veracidad y el sesgo.

3.4 Evaluación de parámetros analíticos

3.4.1 Límite de detección y cuantificación

Se llevó a una concentración a escala de McFarland 0.5 (una suspensión bacteriana equivalente en turbidez que contiene aproximadamente 10^8 bacterias por mL) de la cepa de referencia *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 suspendida en agua peptona, cuando se obtuvo la turbidez buscada se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta llegar a la concentración 10^1 UFC/mL y de ésta se hicieron diluciones intermedias (1:2, 1:3, 1:4 de acuerdo a la necesidad). Se tomó la media y la desviación estándar de la medición de 10 réplicas por duplicado con la dosis más baja detectada, luego de aplicar factores de dilución a una muestra con la cepa de referencia.

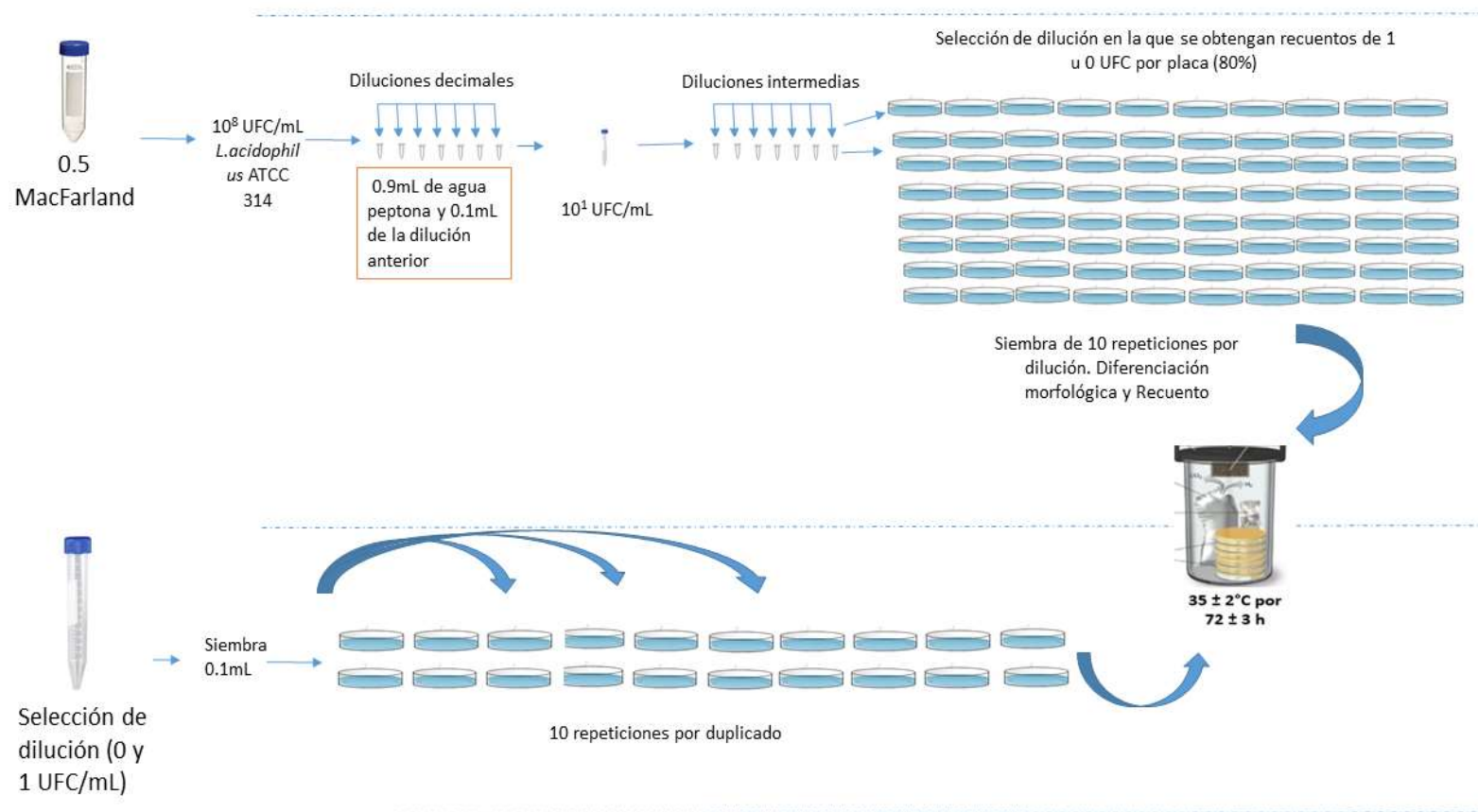


Figura 1. Límite de detección y cuantificación

3.4.2 Linealidad

La verificación de la curva de calibración requiere muchas muestras diferentes del material de referencia y el número de niveles examinado de concentraciones es una función del rango de concentraciones a ser usado en la práctica, es decir, que el rango debe establecerse de acuerdo al uso para el cual se aplicará. Debido a esto, para establecer la curva de calibración se utilizaron siete niveles de concentración de la cepa de referencia partiendo de un patrón McFarland de 0.5 hasta llegar a la concentración $10^{3.15}$ (1/1413) a 10^1 (1/10) UFC/mL (Ver figura 2). En este rango de concentración se realizó la siembra de 10 repeticiones de concentraciones intermedias que contenían a *L. acidophilus* ATCC 314 y se realizaron pruebas estadísticas y análisis de ANOVA a los resultados obtenidos para evaluar la linealidad (Norma técnica colombiana. NTC 5014, 2001).

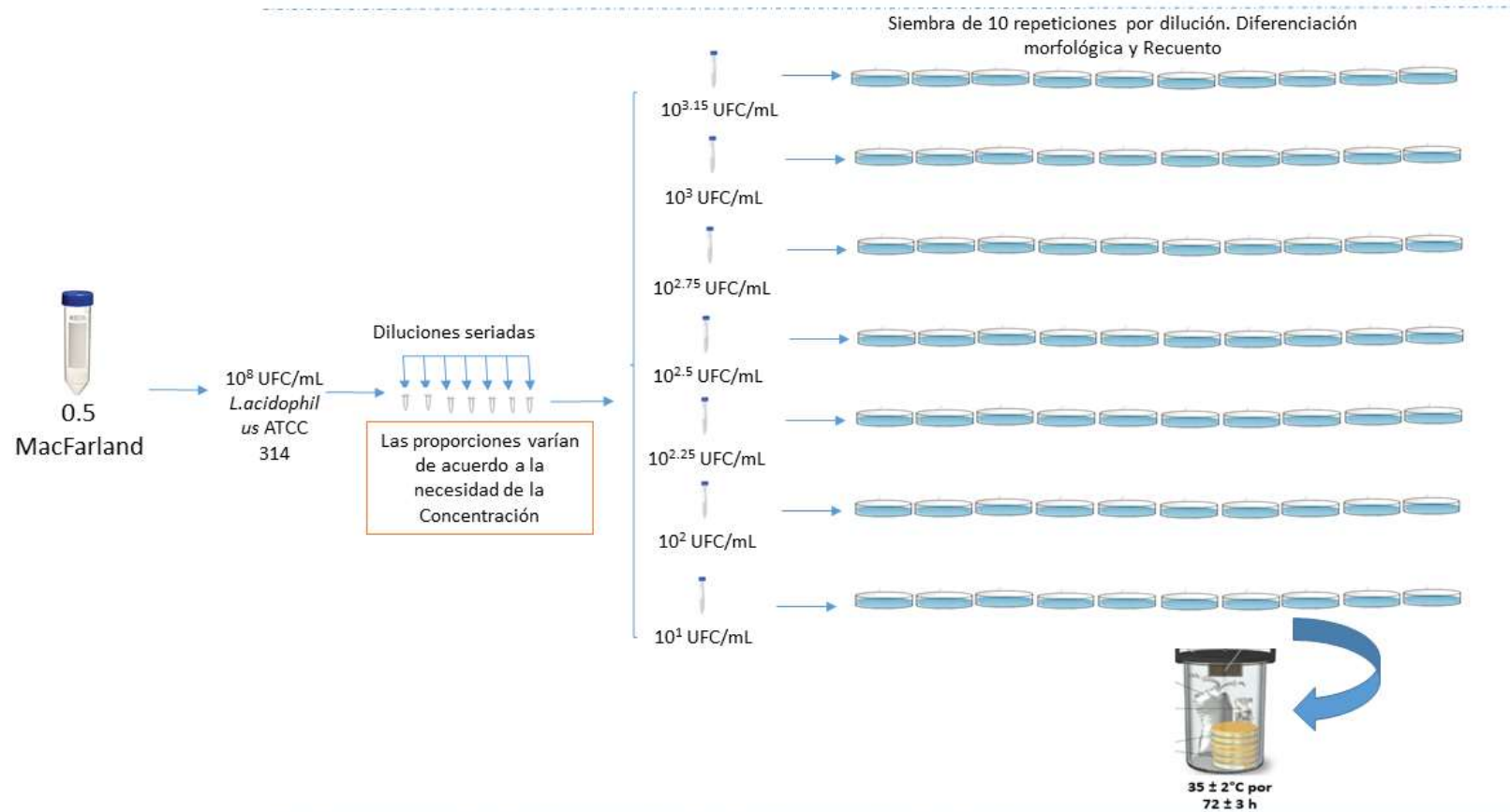


Figura 2. Linealidad

Los procedimientos de duplicados se llevarán a cabo como se muestra en la Figura 3. Las repeticiones de cajas de Petri se inoculan con cada dilución decimal en agar HHD.

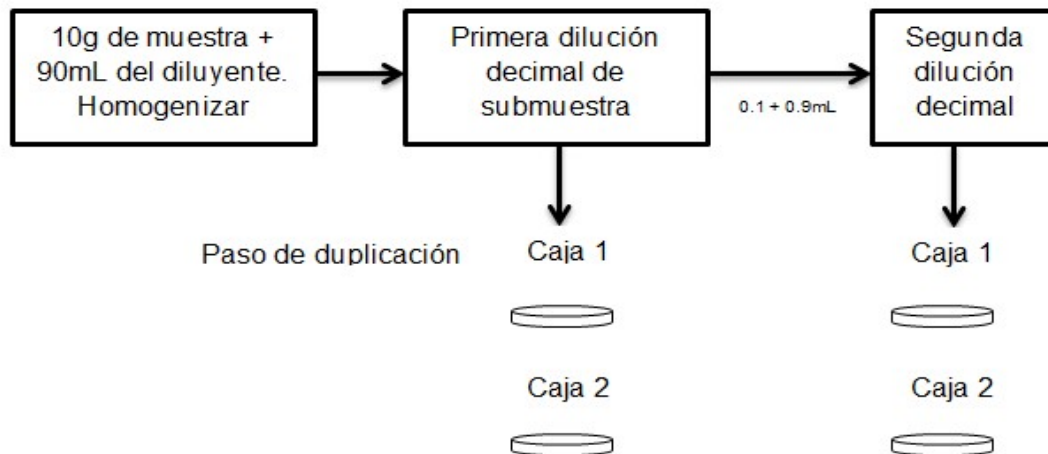


Figura 3. Representación de las siembras por duplicado en caja de Petri

3.4.3 Veracidad

Se realizó teniendo en cuenta una captura de datos con mínimo 30 repeticiones de la cepa de referencia *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, determinando el grado de concordancia entre el promedio de una serie de mediciones y el mesurando (ISO 5725) (International Standard, 1994). A partir de 10 réplicas de tres niveles de concentración se determinó si hay una variación estadísticamente significativa del método recuento en placa de agar HHD.

Se utilizó como matriz el Yogur (Yagur marca comercial Colanta®). Por lo que se hizo un dopaje de la matriz con un patrón McFarland de 0.5 (10^8 UFC/mL o g), obteniéndose así una muestra fortificada.

Se pesaron 10g del yogur 4 veces en 90mL de agua triptona sal, se inocularon intencionalmente (forticaron) tres muestras con 1mL cada una, de concentración Baja (10^1 UFC/mL o g), Media (10^2 UFC/mL o g) y Alta (10^3 UFC/mL o g), y la cuarta muestra se dejó como control de la matriz. Se homogenizaron las muestras y se sembraron como se describe en el numeral 3.2.1 en agar HHD, 10 repeticiones por concentración.

La muestra fortificada de concentración baja se sembró en superficie en agar HHD en 10^5 , la media en 10^6 y alta en 10^7 . Igualmente se sembraron por triplicado las concentraciones con las que se inoculó la matriz, y por triplicado la matriz sin fortificar.

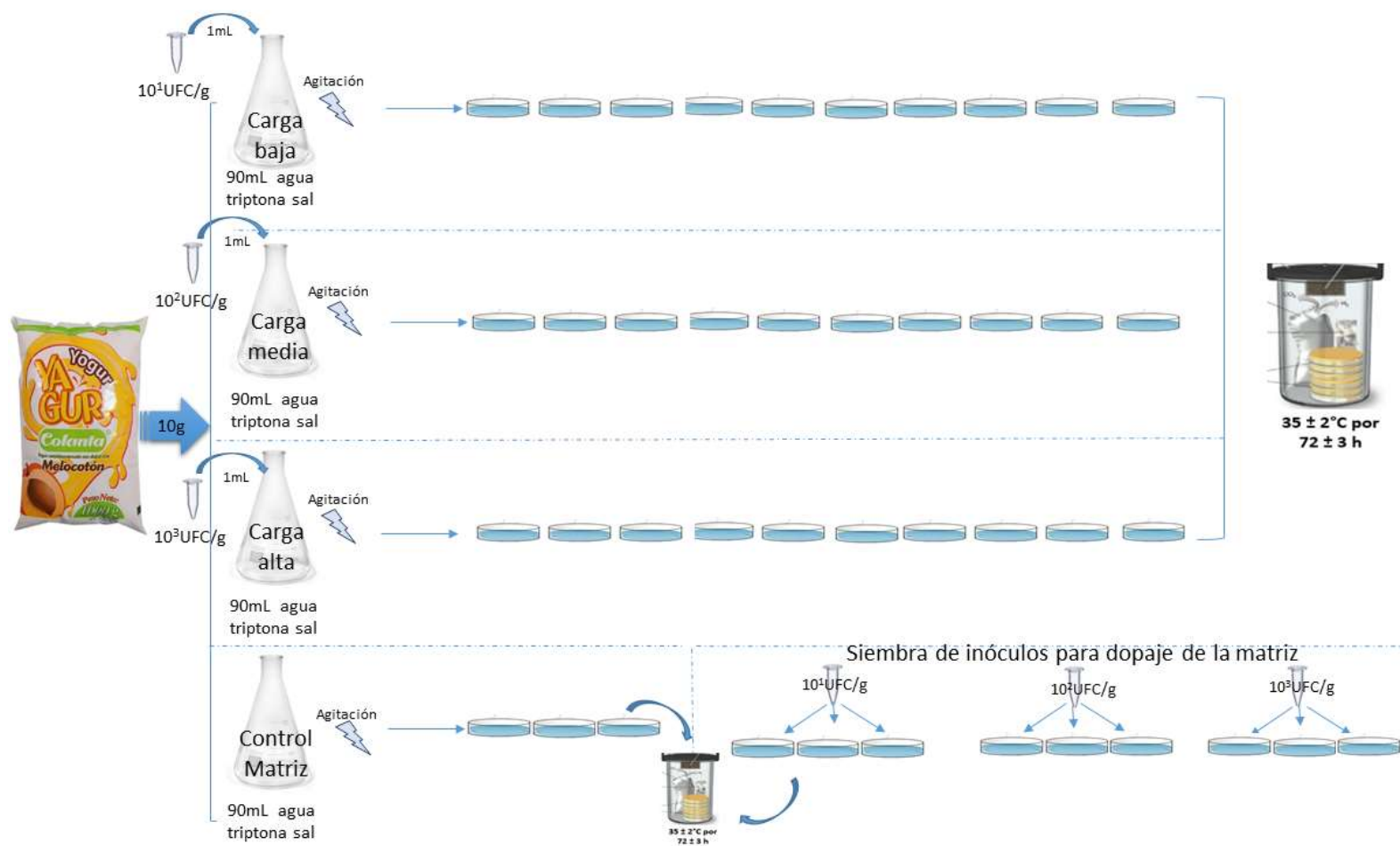


Figura 4. Veracidad

3.4.4 Evaluación de Inclusividad

Se seleccionaron 47 cepas deseadas y no deseadas que pueden encontrarse en matrices lácteas, incluso en el yogur (Ver Figura 5). Para la inclusividad en agar HHD se utilizaron bacterias ácido lácticas (BAL), representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general son productoras de ácido láctico después de llevar a cabo el proceso de fermentación de azúcares como la lactosa y la glucosa. Son microorganismos no esporulados, cocos o bacilos con una limitada capacidad biosintética. Dentro de las BAL se evaluaron los géneros - *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, *Lactobacillus acidophilus* La3, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*), *Pediococcus* (*Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*), *Enterococcus* (*Enterococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus* sp, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), *Leuconostoc* (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*), *Streptococcus* (*Streptococcus infantarius*) *Lactococcus* (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*) y *Weissella* (*Weissella viridescens*)-. También se evaluaron otros microorganismos con importancia en la industria de alimentos, géneros como *Candida* (*Candida albicans* ATCC 10231), *Bacillus* (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 19659), *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus warneri*), también de la familia *Enterobacteriaceae* (*E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* 13048, *Citrobacter freundii* ATCC 6538, *Salmonella* spp. ATCC 12017, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Shigella sonnei* ATCC9290, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ATCC 25933), *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium breve* ATCC 15700), *Listeria* (*Listeria innocua* ATCC 19118, *Listeria monocytogenes* ATCC 19118), *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) y *Burkholderia* (*Burkholderia cepacia*).

Las cepas puras provenientes de cultivos de laboratorio constituyen las muestras de prueba. El medio de cultivo HHD es diferencial pero no selectivo, por lo tanto, sólo se evaluó la inclusividad por medio de la siembra de las cepas descritas antes, unas provenientes de casas de colección ATCC y otras nativas aisladas de matrices lácteas (FANEGAS et al., 2017), con las cuales se realizaron pruebas ecométricas tal y como se describe en la *Guía de aseguramiento de la calidad, valoración de medios de cultivo y validación microbiológica cualitativa para los laboratorios de microbiología de alimentos* del INVIMA (Ana Isabel Muñoz Cajiao, 2011). Ver Figura 6.

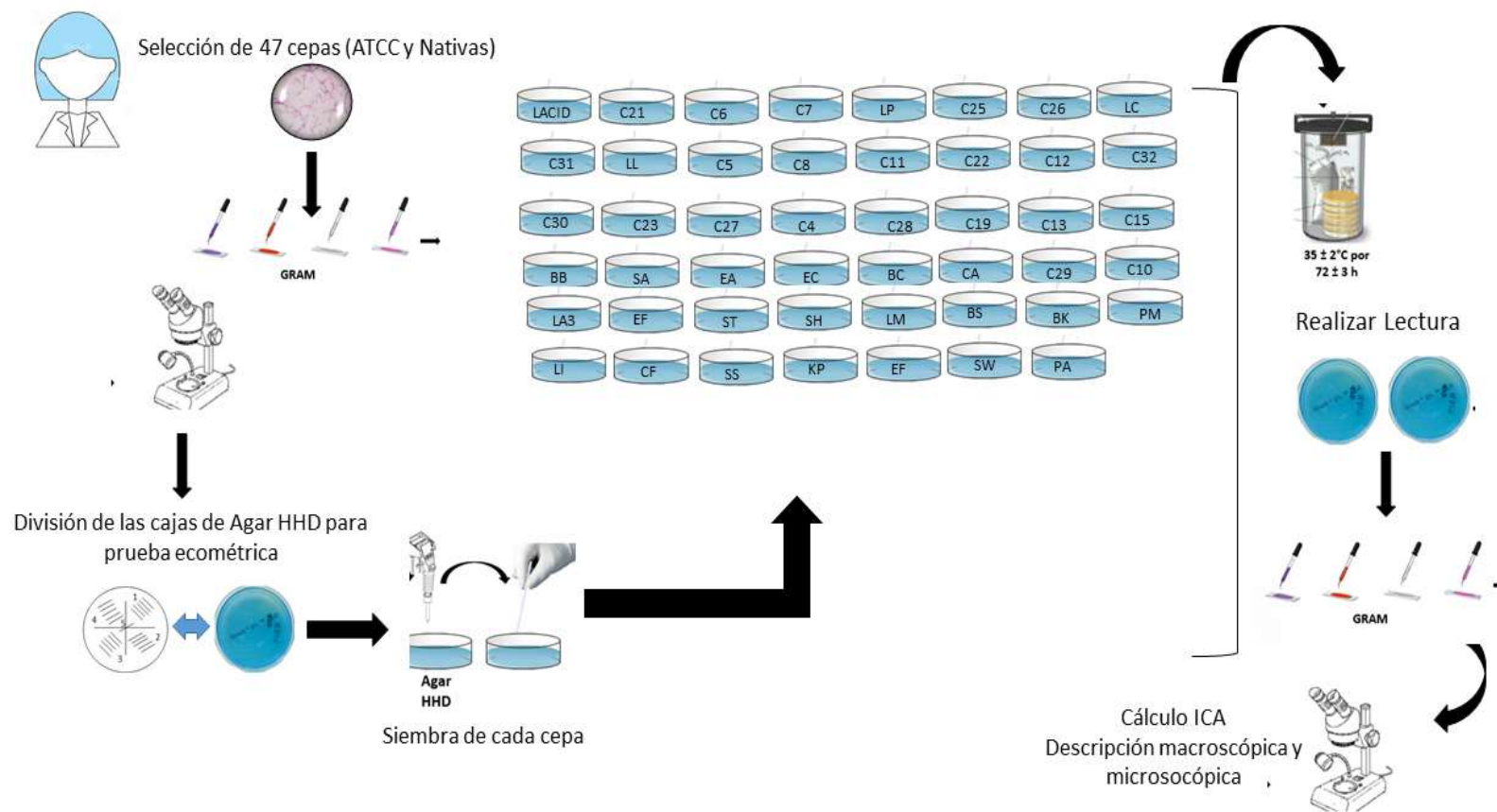


Figura 5. Inclusividad

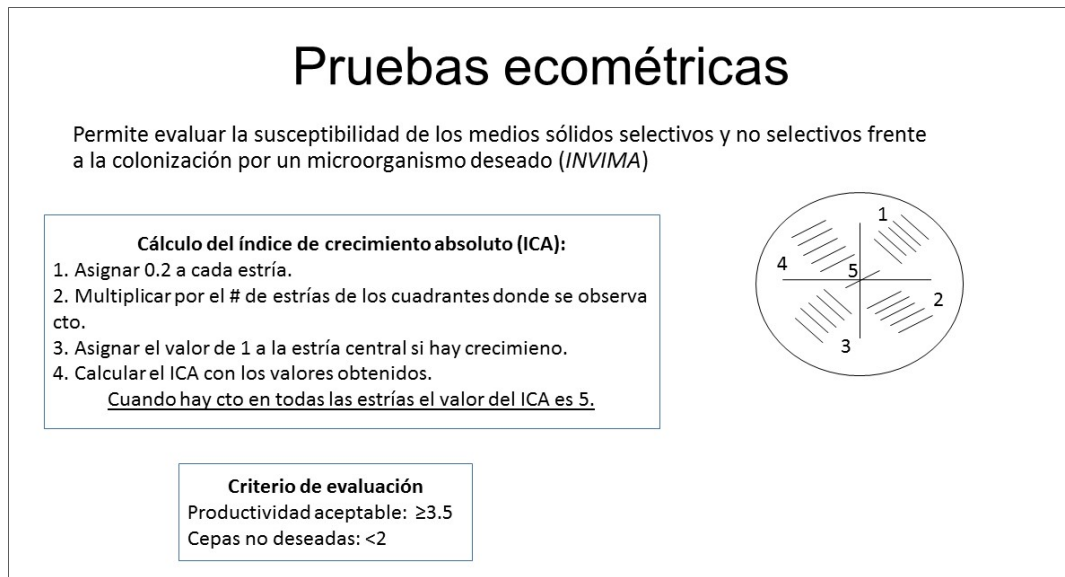


Figura 6. Representación de las pruebas ecométricas

3.4.5 Repetibilidad

Tres analistas realizaron en conjunto 30 veces el método de recuento en placa descrito en el numeral 3.2.1 bajo las mismas condiciones, la misma matriz, mismo método, mismo día, cuyo rango de validación fue de 10^6 UFC/mL o g. Se planificaron las acciones y se documentó la captura de datos, posteriormente se calcularon los parámetros característicos de una distribución de probabilidad: media y desviación estándar, lo que permitió evidenciar el grado de dispersión de los datos con respecto al valor promedio.

Se consideró la desviación estándar de la repetibilidad (S_r) y se aplicaron las fórmulas respectivas para determinar el índice de compatibilidad con el fin de comprobar si existe o no diferencia significativa entre el valor de referencia (10^6 UFC/mL o g) y la media de las repeticiones.

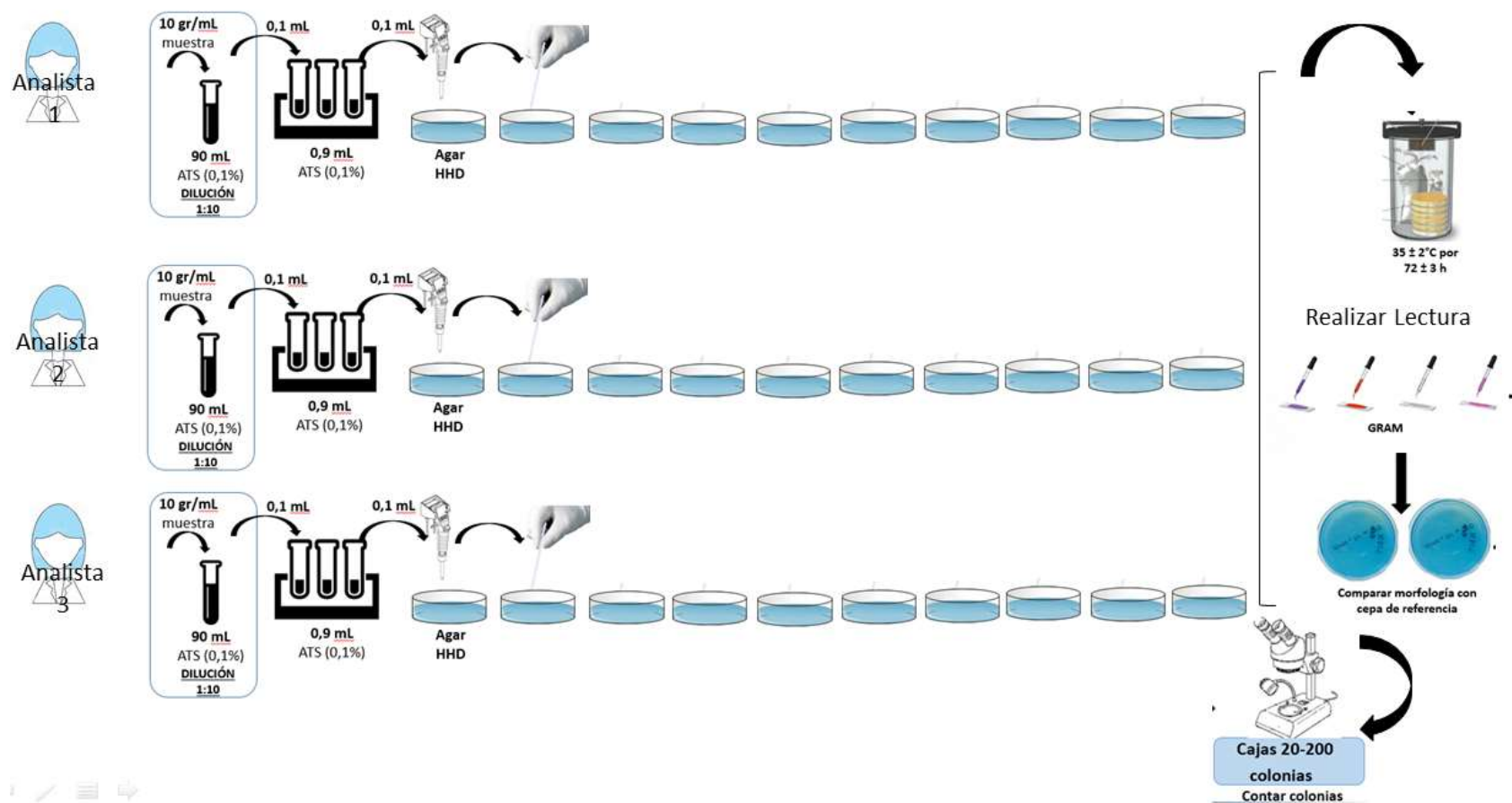


Figura 7. Repetibilidad

3.4.6 Precisión intermedia.

Para la determinación de la precisión del método se llevó a cabo la evaluación realizando siembras seriadas con la matriz contaminada naturalmente: Yagur® Colanta®, se sembró en dos días diferentes y con la participación de tres analistas: Bact. Yesica Yepes, Bact. Daniela Santa y Microb. Diana Marcela Rodríguez.

Para esta medida se tomaron 90 datos experimentales bajo la matriz a evaluar sembrando en agar HHD. La captura de los datos se distribuyó así:

30 datos tomados por la analista Diana Marcela Rodríguez García (DMRG)

30 datos tomados por la analista Yesica Yepes Gutierrez (YYG)

30 datos tomados por la analista Daniela Santa Zapata (DSZ)

Las tres analistas realizaron el procedimiento normalizado descrito en el numeral 3.2.1 en dos días diferentes, aunque el método fue el mismo. Luego se aplicó la fórmula para determinar qué tan reproducible es el método cuando con el rango de validación de 10^5 a 10^7 UFC/mL o g.

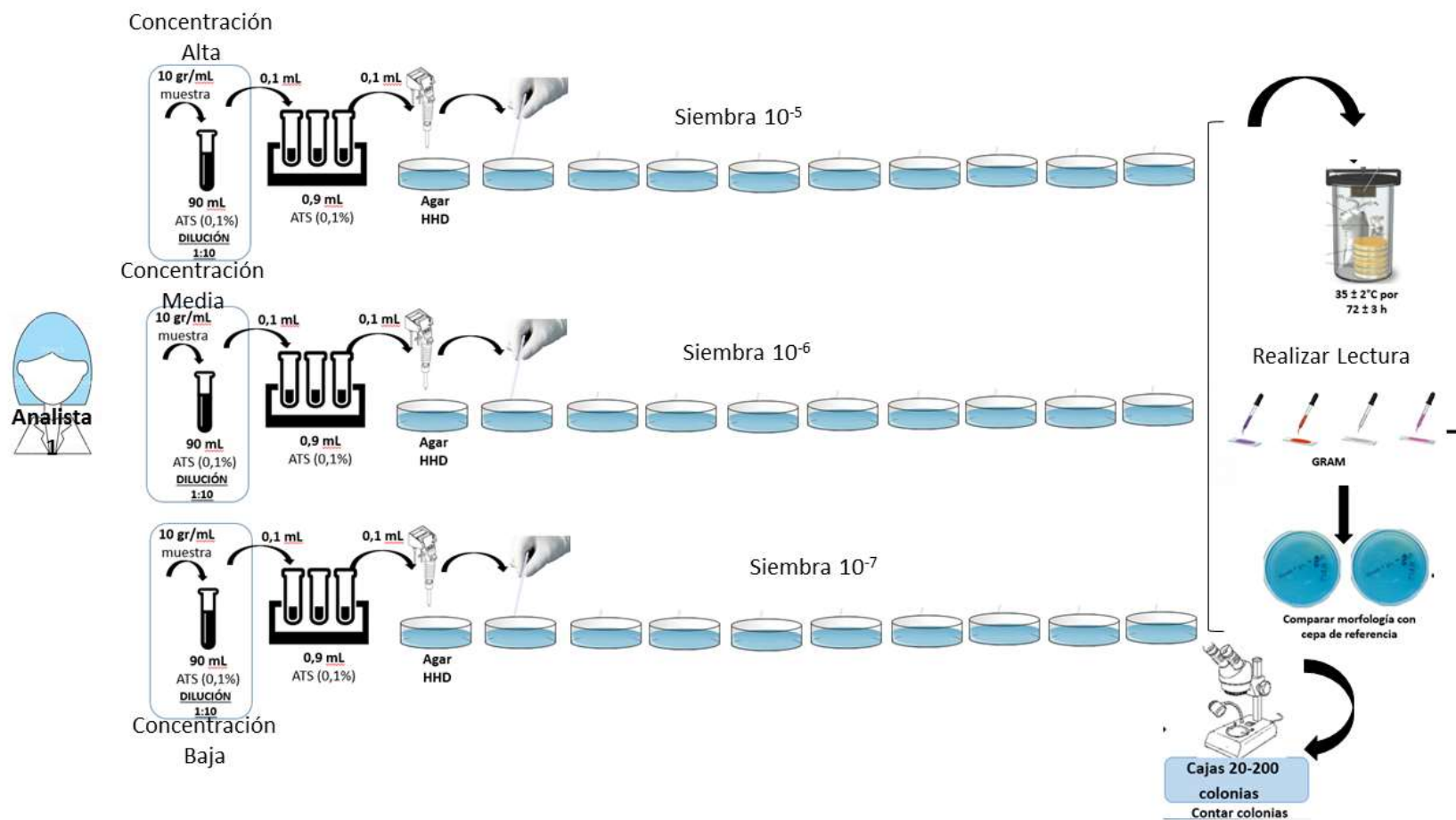


Figura 8. Precisión intermedia por analista

3.5 Estimación de la incertidumbre

Este parámetro está asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando. El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación estándar (o un múltiplo de ella), o la mitad de un intervalo de un nivel de confianza determinado. Este parámetro se calculará empleando cálculos matemáticos, que permitirán conocer la dispersión de los valores atribuidos al mensurando, de acuerdo a la ISO 19036:2006 *Microbiology of food and animal feeding stuffs-Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations* (Specification, 2006).

3.6 Tratamiento de los datos

Todos los datos deben cumplir con los criterios de normalidad, de acuerdo a esto, después de obtenidos los resultados mediante el diseño estadístico aplicado para garantizar la validez de este análisis de varianza (ANOVA), es necesario que se cumpla el criterio de normalidad, es decir, la distribución de los residuales sea normal (que se ajuste a una curva gaussiana). Cómo los datos que se obtendrán será en UFC/mL o g, éstos siguen una distribución asimétrica, por lo que se realizó una transformación matemática previa a fin de realizar el tratamiento estadístico propuesto. Para ellos se transformarán los datos de UFC/mL o g a Logaritmo en base 10 (Convention, 2007).

4. RESULTADOS

A continuación se detallan los resultados obtenidos para los atributos evaluados.

4.1 Límite de detección y cuantificación

Después de realizar la siembra de 10 muestras en la dilución más baja cuantificable se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 3. Límite de detección para el recuento de *L. acidophilus* ATCC 314 en el medio de cultivo agar HHD a la temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas de incubación en anaerobiosis

LÍMITE DE DETECCIÓN AGAR HHD													
Concentración UFC/mL	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	Replica 8	Replica 9	Replica 10	Promedio	Mediana (Xo)	Desviación estándar (SD)
10-0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8	1	0,422
10-0,7	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1			
10-1	2	2	3	5	2	4	2	3	5	4			
10-2	29	20	30	25	22	20	21	31	26	25			
10-2,5	55	57	57	74	62	61	70	60	63	52			
10-3	119	128	125	126	138	115	118	125	127	115			
10-3,2	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200			
10-3,5	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200			

Se determinaron los límites de acuerdo a la cantidad más baja detectada por el método (concentración $10^{0.7}$), calculando la mediana (X_o) y la desviación estándar (SD) para aplicar las fórmulas descritas en la ISO 16140-2:2016 (Iso, 2017). El Límite de detección ($\text{LOD} = (3,3 * \text{SD}) + X_o$) para el método de recuento en placa HHD es de 2 UFC/mL o g (es la menor concentración o cantidad absoluta de un analito que produce una señal significativamente mayor que la que se obtiene con el blanco de reactivo) y el límite de cuantificación ($\text{LOQ} = (10 * \text{SD}) + X_o$) es 5 UFC/mL o g, siendo esta la concentración o cantidad absoluta más pequeña de un analito que puede determinarse con seguridad (OAA, 2013).

Se determinaron los límites de acuerdo a la cantidad más baja detectada por el método (concentración $10^{0.7}$), calculando la mediana (X_o) y la desviación estándar (SD) para aplicar

las fórmulas descritas en la ISO 16140-2:2016 (Iso, 2017) . El Límite de detección ($LOD = (3,3*SD) + X_0$) para el método de recuento en placa HHD es de 2 UFC/mL o g (es la menor concentración o cantidad absoluta de un analito que produce una señal significativamente mayor que la que se obtiene con el blanco de reactivo) y el límite de cuantificación ($LOQ = (10 \times SD) + X_0$) es 5 UFC/mL o g, siendo esta la concentración o cantidad absoluta más pequeña de un analito que puede determinarse con seguridad (OAA, 2013).

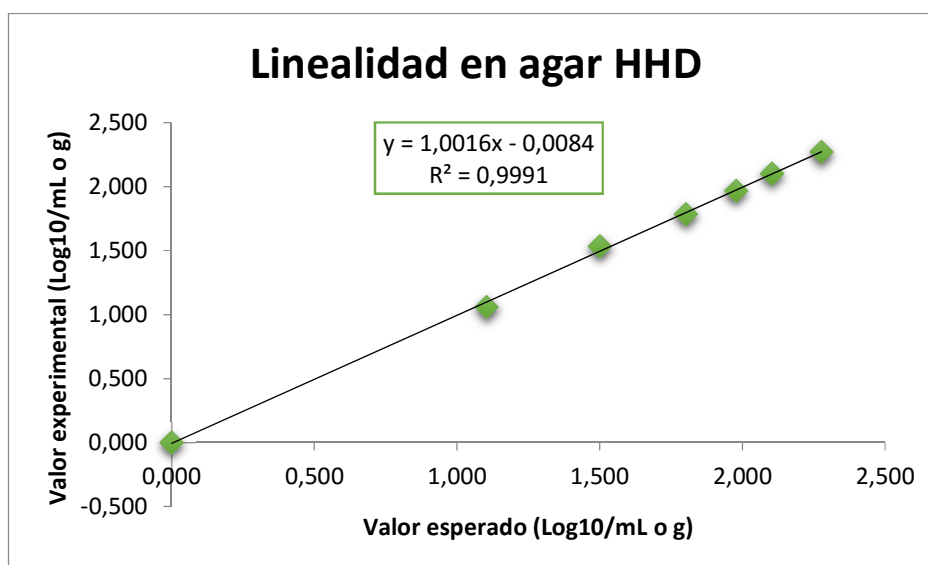
4.2 Linealidad

Después de realizar la siembra de 10 repeticiones de los inóculos desde la concentración $10^{3.15}$ (1/1413) a 10^1 (1/10) UFC/mL o g para obtener resultados intermedios, evitando tener una gráfica de extremos se realizaron diluciones 1/2 respetando el límite de cuantificación del medio de cultivo agar HHD que es hasta 200 UFC.

Tabla 4. Datos de Linealidad para el recuento de *L. acidophilus* en muestra de yogur semidescremado Colanta® en el medio de cultivo agar HHD a la temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 72 horas de incubación en anaerobiosis.

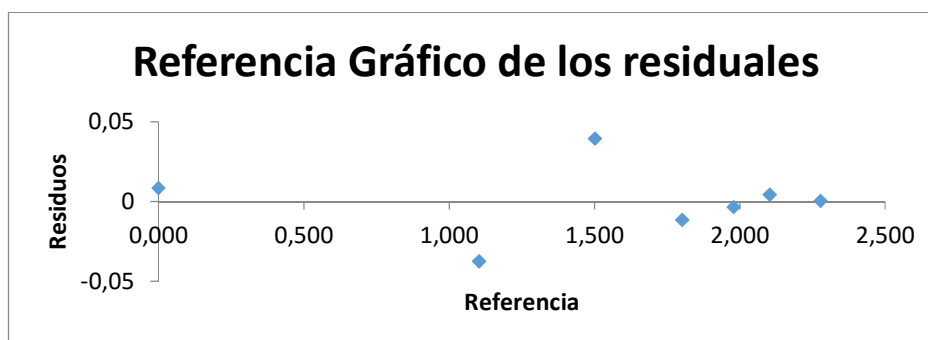
Concentración UFC/mL	Promedio LOG Esperado (Log10/mL)	Promedio LOG Experimental (Log10/mL)
$10^{3.15}$ (1/1413)	2,277	2,273
10^3 (1/1000)	2,103	2,102
$10^{2.75}$ (1/562)	1,978	1,970
$10^{2.5}$ (1/316)	1,802	1,785
$10^{2.25}$ (1/178)	1,501	1,535
10^2 (1/100)	1,103	1,059
10^1 (1/10)	0,000	0,000

Con los datos de la tabla 4 se obtiene la siguiente gráfica lineal:



Gráfica 1. Regresión lineal de los datos obtenidos para el recuento de *L. acidophilus* en agar HHD.

Se obtuvo un buen coeficiente de correlación ($R^2=0,9991$), es decir que la concentración del microorganismo presente en la muestra es proporcional a la cantidad detectada por el método (OAA, 2013), existiendo una relación relativamente fuerte entre las variables.



Gráfica 2. Residuales obtenidos de la determinación de Linealidad para el recuento de *L. acidophilus* en agar HHD.

El gráfico de residuales indica que tan dispersos están los datos respecto a la media. Por lo que se evidencia que estos no superan los 0.05 Log₁₀. Es decir que están muy cercanos los datos entre sí.

Tabla 5. Estadísticas de regresión de la linealidad

Resumen	
<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,999
Coeficiente de determinación R ²	0,999
R ² ajustado	0,999
Error típico	0,025
Observaciones	7

El error típico indica la desviación estándar de los residuos, este valor es una medida de la variación que existe entre las observaciones en las unidades experimentales y que no puede evitarse.

Tabla 6. Análisis de varianza

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	<i>Referencia</i>	<i>Experimental</i>
Media	1,538	1,532
Varianza	0,614	0,617
Observaciones	7	7
Coeficiente de correlación de Pearson	0,999	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6	
Estadístico t	0,673	
P(T<=t) una cola	0,263	
Valor crítico de t (una cola)	1,943	
P(T<=t) dos colas	0,526	
Valor crítico de t (dos colas)	2,447	

En esta tabla el valor del estadístico t es 0,673. El punto positivo que delimita la región crítica y de aceptación para el caso bilateral aparece como valor crítico para dos colas 2,447 ya que se asume para este caso diferencia entre las medias. También aparece el valor crítico para una cola, es decir, cuando en la hipótesis nula se asume un sentido a las diferencias y se plantea la hipótesis nula como: la media de A es mayor que la media de B. Se puede ver que el valor positivo para una cola es 1,943.

Para este caso, la hipótesis nula para linealidad se asume igualdad, y el estadístico $t < t_{\text{crítico}}$, se puede decir que no hay diferencia significativa entre la media de la variable teórica o esperada con la experimental.

4.3 Veracidad

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7. Resultados de la prueba de veracidad del agar HHD en Yogur

Descripción del parámetro	Rangos de Concentración			Promedio
	Baja	Media	Alta	
Concentración en UFC/mL del Inóculo (<i>L. acidophilus</i> ATCC 314)	5	31	171	
Matriz natural en UFC/mL o g (Yogur sin dopaje)	104	104	104	
Matriz dopada en UFC/mL o g (ATCC + Matriz natural)	109	135	275	
LOG10 Inóculo	0,699	1,491	2,233	
LOG10 Matriz	2,017	2,017	2,017	
LOG10 Matriz dopada	1,754	2,139	2,385	
LOG10 Inóculo + Matriz	2,037	2,130	2,439	
Sesgo (Matriz dopada - (Inóculo+Matriz))	0,283	-0,008	0,054	0,110
% Recuperación	86,1	100,4	97,8	94,8
DS	0,952	0,950	1,081	0,994
CV	1,106	0,947	1,105	1,053

Se obtiene un porcentaje de recuperación promedio del 94,8% en las tres concentraciones evaluadas, una desviación estándar de 0,994, un coeficiente de variación del 1,05% y un sesgo del 10,98%. El sesgo es la diferencia entre los resultados esperados y los valores de referencia aceptados. Es el error total sistemático en contraste con el error aleatorio. Pueden existir uno o más errores sistemáticos que contribuyan a los sesgos. Una gran diferencia sistemática a partir de los valores de referencia aceptados se refleja en un elevado valor de sesgo (Ortega González, Rodríguez Martínez, & Zhurbenko, 2013), éste debe ser inferior al 15%.

Tabla 8. Análisis de varianza


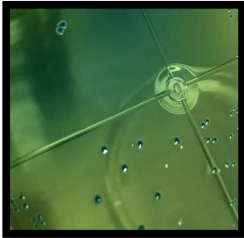
Prueba F para varianzas de dos muestras		
	<i>Log10 MR</i>	<i>Log10 ME</i>
Media	2,202	2,093
Varianza	0,031	0,070
Observaciones	30	30
Grados de libertad	29	29
F	0,435	
P(F<=f) una cola	0,014	
Valor crítico para F (una cola)	0,537	

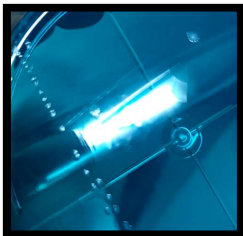

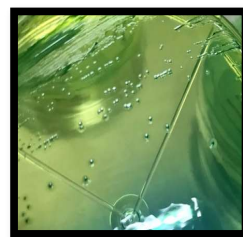
Con esta prueba se pretende comprobar la igualdad de varianzas, con un $F_{\text{calculado}}$ (0,435) menor al $F_{\text{crítico}}$ (0,537), se determina que no hay diferencia significativa entre la varianzas de las concentraciones evaluadas, respecto al valor verdadero o esperado.

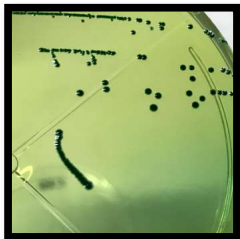
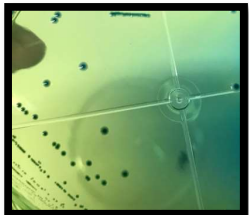


4.4 Inclusividad

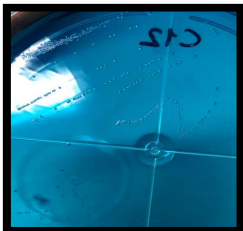
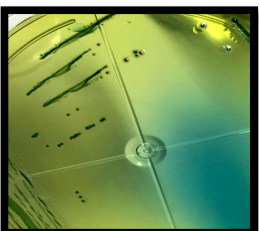
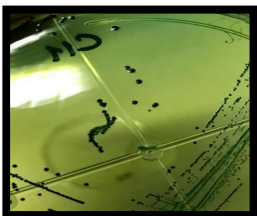

Los resultados de inclusividad del medio HHD se detallan a continuación:

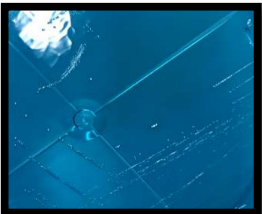


Tabla 9. Resultados de la prueba de inclusividad del medio HHD con cepas nativas y ATCC

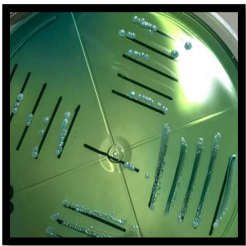
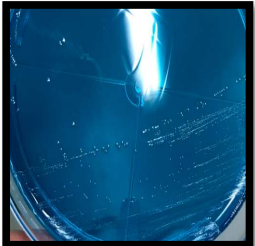
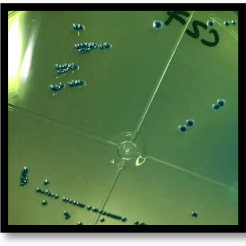
Código cepa	Nombre de la cepa	Ecométrica (ICA)	Fotografía	Característica macroscópica	El medio cambia de color	Característica microscópica
LACID	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	4.0		Colonia irregular en forma de coliflor verde, plana sin elevación	SI	Bacilos Gram positivos en cadena, grandes que forman hilos
C21	<i>Pediococcus acidilactici</i>	4.4		Colonia con bordes definidos, redonda, blanca con centro verde oscuro, cremosa.	SI	Cocos gram positivos


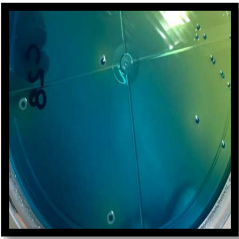
C6	<i>Lactobacillus fermentum</i>	5.0		Colonia azul pequeña puntiforme, con bordes definidos, translúcida.	O ^N	Bacilos gram positivos, cortos y delgados
C7	<i>Enterococcus lactis</i>	2.4		Colonia verde oscuro, con bordes blancos y definidos, elevada y brillante	SI	Cocos gram positivos
LP	<i>Lactobacillus plantarum</i>	5.0		Colonia blanca en forma de coliflor, cremosa con centro pequeño elevado y verde	SI	Bacilos gram positivos, medianos

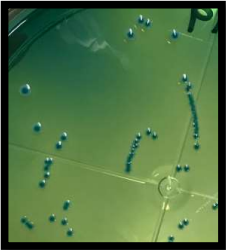


C25	<i>Enterococcus faecium</i>	2.8		Colonia verde con centro oscuro y borde blanco definido, elevada y brillante	SI	Cocos gram positivos, grandes
C26	<i>Enterococcus faecium</i>	5.0		Colonia verde con centro oscuro y borde blanco definido, elevada y brillante	SI	Cocos gram positivos, grandes
LC	<i>Lactobacillus casei</i>	1.2		Colonia verde con bordes blancos, cremosa con borde definido.	SI	Bacilos gram positivos
C32	<i>Lactobacillus fermentum</i>	4.2		Colonia azul pequeña puntiforme, con bordes definidos, translúcida.	O N	Bacilos gram positivos, cortos y delgados

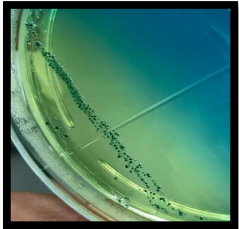
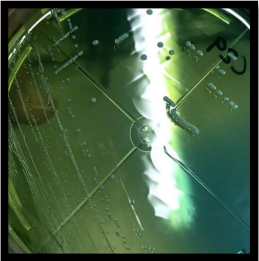

C12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	5.0		Colonia azul pequeña, opaca	O ^N	Bacilos gram positivos, largos y delgados
C22	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	5.0		Colonia transparente con centro verde, bordes irregulares y centro elevado	O ^N	Bacilos gram positivos, largos y delgados
C11	<i>Streptococcus infantarius</i>	5.0		Colonia elevada verde oscuro, con borde transparente y definido,	SI	Cocos gram positivos en cadena
C8	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3.8		Colonia pequeña, borde definido, transparentes, levantada, lisa.	O ^N	Cocos gram positivos pequeños, en racimos

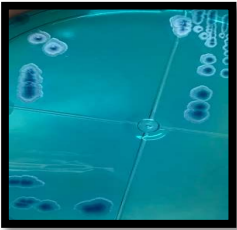



C5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1.8		Colonia pequeña, borde definido, transparentes, levantada, lisa.	O N	Cocos gram positivos pequeños, en racimos
LL	<i>Lactococcus lactis</i>	3.0		Colonia verde oscuro, con bordes muy delgados y de un verde más claro, colonia con elevación leve y en forma de cono.	SI	Cocos gram positivos en racimos
C31	<i>Lactobacillus casei</i>	5.0		Colonia blanca transparente, con una leve elevación, con un punto en el centro un poco más grande, bordes definidos.	O N	Bacilos gram positivos alargados.



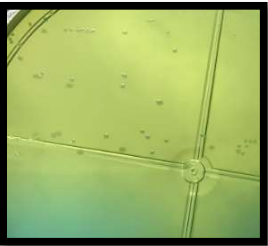
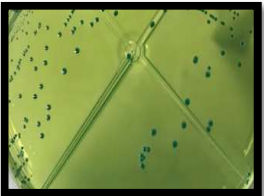
C30	<i>Lactococcus lactis</i>	4.8		<p>Colonia de tamaño mediano, bordes definidos, de color blanco con azul claro, y un centro levantado de color azul cielo, cremosa.</p>	SI	<p>Cocos gram positivos, definidos grandes, dispuestos de manera individual</p>
C23	<i>Lactococcus lactis</i>	4.4		<p>Colonia casi transparente, bordes lisos definidos, de tamaño pequeño y centro elevado, punto central más blanco</p>	O ^N	<p>Cocos gram positivos, agrupados en pares o cadenas cortas</p>
C27	<i>Enterococcus faecium</i>	4.6		<p>Colonia verde con centro oscuro y borde blanco definido, elevada y brillante</p>	SI	<p>Cocos gram positivos, grandes</p>


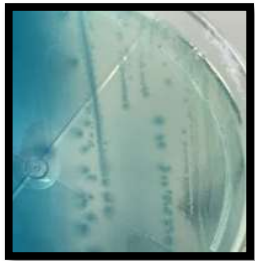
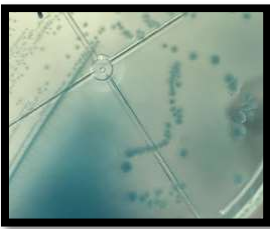

C4	<i>Enterococcus</i> sp.	5.0		<p>Colonia de gran tamaño, bordes no definidos, textura levemente rugosa, colonia transparente en sus bordes, leve elevación en el centro y de color blanco.</p>	<p>O N</p>	<p>Cocos gram positivos, agrupados en pares o cadenas</p>
C28	<i>Weissella viridescens</i>	5.0		<p>Colonia grande de borde definido pero no siempre perfectamente circular, bordes transparentes, color blanco o azul claro y centro elevado, con punto verde azul oscuro y un borde en azul más claro.</p>	<p>SI</p>	<p>Barras cocoides gram positivos, agrupados en cadenas cortas</p>

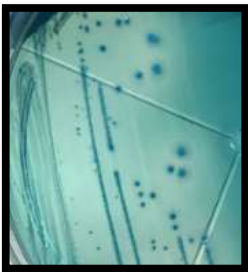


C19	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	5.0		Colonias de tamaño mediano, textura lisa, elevadas, borde definido pero no siempre circular, borde azul claro y centro verde azul oscuro en degradé.	SI	Cocos gram positivos pequeños, en racimos
C13	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	5.0		Colonia pequeña, borde definido, transparentes, levantada, lisa.	O N	Cocos gram positivos pequeños, en racimos
C15	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	0.8		Colonia pequeña y de borde transparente, definido, con elevación, lisa sin puntos.	SI	Bacilos muy cortos gram positivos.

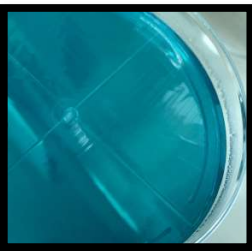
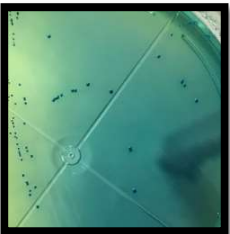


C10	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	2.8		Colonias pequeñas, borde no definido y levemente rugoso, centro elevado y liso, borde azul clarito, centro verde azul muy oscuro y elevado	SI	Cocos gram positivos pequeños, en racimos
C29	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	3.6		Colonias de tamaño mediano con bordes definidos y transparentes, centro azul claro y punto central azul cielo pequeño con apariencia de ojo de pescado.	SI	Bacilos gram positivos, largos y delgados
CA	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	5.0		Colonia de gran tamaño, color blanco de bordes definidos algodonosos.	NO	Estructuras ovaladas


BC	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	5.0		Colonias de gran tamaño, planas, bordes no definidos de color azul claro y va llegando al centro con tonos azules más oscuros, el centro tiene forma circular pero en general la colonia es plana y opaca.	O N	Bacilos gram positivos
EC	<i>E. coli</i> ATCC 25922	4.2		Colonias grandes, brillantes, bordes no definidos con apariencia de hoja, textura no lisa.	O N	Bacilos gram negativos
SA	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5.0		Colonias pequeñas circulares, bordes definidos, levantadas levemente, lisas, brillantes, color verde oscuro.	SI	Cocos gram positivos en racimos
EA	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC13048	2.2		Colonias grandes, cremosas, entre azules y bordes transparentes con centro elevado.	O N	Bacilos gram negativos

BB	<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700	3.8		Colonias puntiformes elevadas, con forma de gota de agua, bordes definidos.	NO	Bacilos irregulares gram positivos
LA3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La3	4.8		Colonia irregular en forma de coliflor verde, plana con elevación en el centro	SI	Bacilos Gram positivos en cadena, grandes que forman hilos
LI	<i>Listeria innocua</i> ATCC 19118	3.8		Colonia pequeña blanca cremosa borde definido sin diferenciación central	SI	Bacilos gram positivos no esporulado, en cadena.
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>	4.6		Colonia mediana de color azul brillante con borde definido.	SI	Cocos gram positivos que forman cadenas

CF	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 6538	5.0		Colonia verde azul claro con bordes en degradé irregulares, aplanada. El centro es de color azul oscuro con elevación y los alrededores blancos planos.	N O	Bacilos gram negativos
SS	<i>Salmonella</i> spp. ATCC 12017	3.0		Colonia grande irregular con centro azul elevado y circular, bordes en degradé	N O	Bacilos gram negativos
ST	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	5.0		Colonia verde azul claro con bordes en degradé irregulares, aplanada. El centro es de color más oscuro con elevación y los alrededores blancos planos.	N O	Bacilos gram negativos
SH	<i>Shigella sonnei</i> ATCC9290	0		No hay crecimiento	--	--


KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.6		Colonia grande cremosa con centro elevado azul y bordes transparentes. Forma irregular expandida	N O	Bacilos gram negativos cortos
LM	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118	5.0		Colonia pequeña puntiforme, transparente con centro verde claro. Forma irregular y cremosa.	SI	Bacilos gram positivos pequeños.
EF	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	4.2		Colonia mediana de color verde brillante con borde definido.	SI	Cocos gram positivos que forman cadenas

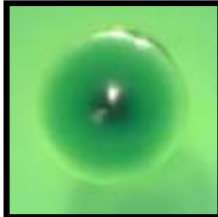

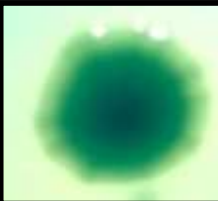

BS	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	0		No hay crecimiento	--	--
SW	<i>Staphylococcus warneri</i>	2.4		Colonia azul clara con centro azul oscuro, pequeña circular con bordes definidos	SI	Cocos gram positivos
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	4.0		Colonia aplanada grande sin centro definido, borde irregular y rugoso	N O	Bacilos gram negativos
BK	<i>Burkholderia cepacia</i>	4.6		Colonia blanca cremosa, irregular con punto central elevado azul, aplanada y expandida	N O	Bacilos gram negativos

PM	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	3.2		Colonia expandida con centro elevado azul, borde irregular y en degradé	N O	Bacilos gram negativos
----	-------------------------------------	-----	--	---	--------	------------------------

De las 47 cepas evaluadas, sólo dos no presentaron crecimiento en agar HHD (*B. subtilis* ATCC 19659 y *Shigella sonnei* ATCC9290), por lo que el 95,7% de las cepas evaluadas tuvo crecimiento en el agar HHD, por ser un medio diferencial más no selectivo se puede hacer una separación morfológica de las colonias y evidenciar el viraje del color del medio, lo que facilita el recuento de *Lactobacillus acidophilus* de la microbiota acompañante, que pueden ser microorganismos adicionados intencionalmente (cultivos iniciadores), como deteriorantes (Hongos, Coliformes totales, entre otros), hasta patógenos (*L. monocytogenes*, *Salmonella* spp.).

Tabla 10. Colonias observadas en el estereomicroscopio utilizando el medio de cultivo agar HHD.

Microorganismo	Fotografía en estereoscopio microscopio (120X de magnificación)	Descripción morfológica
<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700		Colonias puntiformes elevadas, con forma de gota de agua, bordes definidos.

I)	<i>Streptococcus thermophilus</i> (Tipo		Colonias definidas, brillantes con centro elevado, verde oscuro.
II)	<i>Streptococcus thermophilus</i> (Tipo		Colonias azules, con bordes definidos, centro elevado más oscuro.
III)	<i>Streptococcus thermophilus</i> (Tipo		Colonias verdes, de borde irregular y más claro, sin elevación y centro marcado.
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		Colonia blanca con elevación, textura cremosa, con borde definido y algodonoso.	

Lactobacillus delbrueckii subsp.
bulgaricus (Tipo I)



Colona pequeña irregular, opaca,
con borde blanco y centro verde.

Lactobacillus delbrueckii subsp.
bulgaricus (Tipo II)



Colonia pequeña, de color azul,
bode definido y con elevación.

Bacillus cereus ATCC 11778



Colonias de gran tamaño, planas,
bordes no definidos de color azul claro y
va llegando al centro con tonos azules más
oscuros, el centro tiene forma circular
pero en general la colonia es plana y
opaca.

E. coli ATCC 25922



Colonias grandes, brillantes, bordes
no definidos con apariencia de hoja,
textura no lisa.

Enterobacter aerogenes
ATCC13048



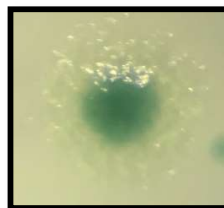
Colonias grandes, cremosas, azules y bordes transparentes con centro elevado.

Staphylococcus aureus ATCC
25923



Colonia cremosa, puntiforme, de tamaño pequeño, blanca y con centro definido y elevado.

Lactobacillus acidophilus La3



Colonia irregular en forma de coliflor, transparente y con centro verde, plana con elevación en el centro. Presenta brillo metálico al movimiento.

Salmonella spp. ATCC 12017



Colonia grande irregular con centro azul elevado y circular, bordes en degradé

Salmonella typhimurium ATCC
14028



Colonia verde azul claro con bordes en degradé irregulares, aplanada. El centro es de color más oscuro con elevación y los alrededores blancos planos

Citrobacter freundii ATCC 6538



Colonia verde azul claro con bordes en degradé irregulares, aplanada. El centro es de color azul oscuro con elevación y los alrededores blancos planos.

Proteus mirabilis ATCC 25933



Colonia expandida con centro elevado azul, borde irregular y en degradé.

Listeria innocua ATCC 19118



Colonia pequeña blanca cremosa borde definido sin diferenciación central.

Burkholderia cepacia



Colonia mediana de color azul brillante con borde definido.

Enterococcus faecalis ATCC
29212



Colonia mediana de color verde brillante con borde definido.

4.5 Repetibilidad y Precisión intermedia

Se determinó el valor de Sr (desviación de repetibilidad) después de realizar la siembra por tres analistas: Bacteriólogas Yesica Yepes y Daniela Santa y la Microbióloga Diana Marcela Rodríguez el mismo día bajo las mismas condiciones y el valor de SR (desviación de reproducibilidad) realizando siembra por las tres analistas en días y concentraciones diferentes.

Tabla 11. Resultados de Repetibilidad

PARÁMETRO	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Sr	0,03	3
SR	0,05	5

La Sr (repetibilidad), es la precisión obtenida cuando todas las mediciones son hechas por el mismo analista durante un solo período de trabajo analítico, utilizando las mismas soluciones y el mismo instrumental y la SR (Precisión intermedia) es la precisión obtenida en cualquier otro conjunto de condiciones, por ejemplo, por distintos analistas o en distintos días de trabajo de laboratorio por un mismo analista. Como la precisión intermedia abarca un número mayor de fuentes de variabilidad, nunca puede ser mejor que la repetibilidad ($Sr < SR$) (Scotter et al., 2001).

Tabla 12. Resultados de Precisión intermedia

CONCENTRACIÓN	PARÁMETRO	RESULTADO
Nivel Bajo	Media (Log10/mL)	1,59
	Desviación estándar	0,07
	Coefficiente de variación	4%
Nivel Medio	Media (Log10/mL)	1,94
	Desviación estándar	0,05
	Coefficiente de variación	3%

Nivel Alto	Media (Log10/mL)	2,32
	Desviación estándar	0,04
	Coefficiente de variación	2%

Para la precisión intermedia se analizaron los niveles de concentración por separado, evidenciándose una desviación y variaciones más altas en concentraciones más bajas en las tres analistas.

Tabla 13. Análisis de varianza Nivel Bajo

ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR							
RESUMEN							
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>			
Columna 1	10	403	40,3	19,789			
Columna 2	10	397	39,7	60,233			
Columna 3	10	373	37,3	25,567			
ANÁLISIS DE VARIANZA							
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>	
Entre grupos	50,4	2	25,2	0,716	,498	3,354	
Dentro de los grupos	950,3	27	35,196				
Total	1000,7	29					

El valor F es menos al F crítico, por lo que no hay diferencia significativa entre las varianzas de las analistas para el nivel Bajo con un 95% de confianza.

Tabla 14. Análisis de varianza Nivel Medio

ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Analista 1	10	941	94,1	90,544		
Analista 2	10	863	86,3	95,344		
Analista 3	10	836	83,6	83,378		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	594,6	2	297,3	3,312	0,052	3,354
Dentro de los grupos	2423,4	27	89,756			
Total	3018	29				

El valor F es menos al F crítico, por lo que no hay diferencia significativa entre las varianzas de las analistas para el nivel medio con un 95% de confianza.

Tabla 15. Análisis de varianza Nivel Alto

ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR						
RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Analista 1	10	2250	225	187,333		
Analista 2	10	2122	212,2	107,733		
Analista 3	10	2084	208,4	412,044		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1512,8	2	756,4	3,209	0,056	3,354
Dentro de los grupos	6364	27	235,704			
Total	7876,8	29				

El valor F es menor al F crítico, por lo que no hay diferencia significativa entre las varianzas de las analistas para el nivel alto con un 95% de confianza.

4.6 Estimación de la incertidumbre

Se identificaron y caracterizaron las fuentes de incertidumbre del método

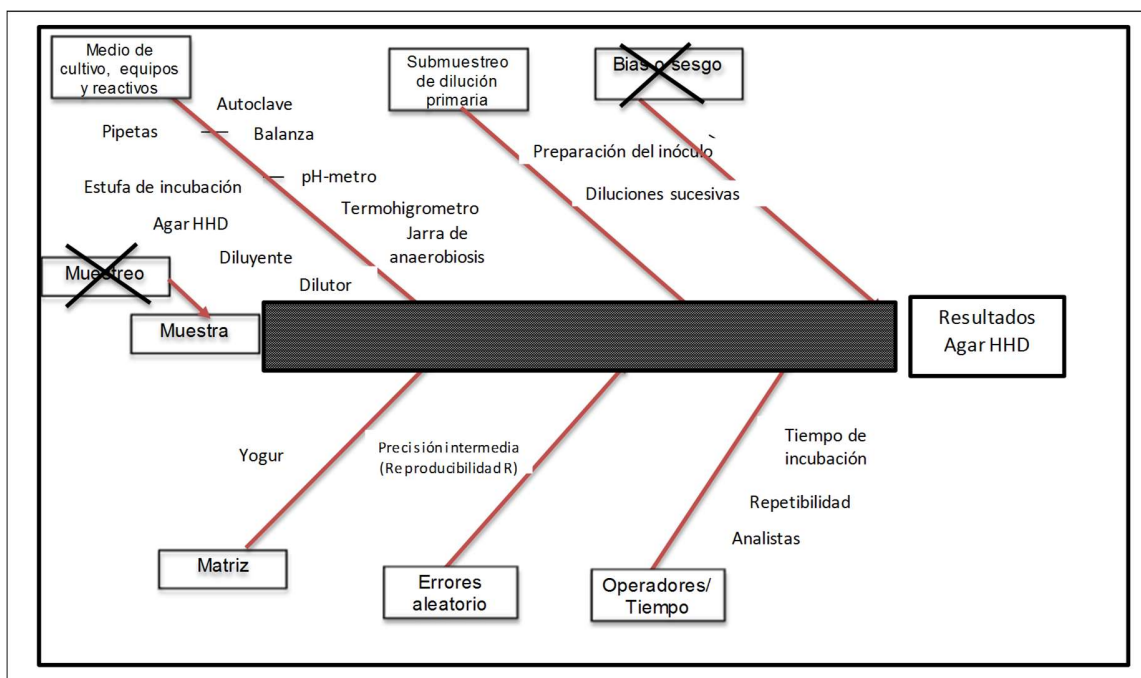


Figura 9. Identificación de las fuentes de incertidumbre (X: Fuente que no se consideró)

Tabla 16. Caracterización de las fuentes de incertidumbre

Descripción	Fuente de incertidumbre	Tipo de Distribución
Pipeta	Certificado	Tipo B
Termo higrómetro	Certificado	Tipo B
Diluyente	Experimental	Tipo A
Balanza	Certificado	Tipo B
Dilutor	Certificado	Tipo B
Autoclave	Certificado	Tipo B
Estufa de incubación	Certificado	Tipo B
Diluciones	Experimental	Tipo A
Muestras	Experimental	Tipo A
Precisión	Experimental	Tipo A

Todas las fuentes fueron contempladas en la precisión intermedia, basados en la ISO 19036:2006 (Specification, 2006). El método de recuento en placa en agar HHD tiene una incertidumbre combinada (u) y expandida (U) con un 95% de confianza obtenida en el método validado.

Tabla 17. Incertidumbre del método

Incertidumbre combinada (u)	0,050 log ₁₀ /mL
Incertidumbre Expandida (U)	0,106 log ₁₀ /mL

5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Debido a la necesidad que tiene la industria alimentaria, de evaluar en forma rápida la calidad microbiológica de las materias primas y productos terminados, así como el estado microbiológico de procedimientos de manufactura, ha llevado al desarrollo y refinamiento de métodos microbiológicos alternos de análisis más rápidos o más fáciles que el método correspondiente de referencia (Norma técnica colombiana. NTC 5014, 2001). Entre estos métodos, algunos pueden generar resultados equivalentes a los suministrados por el correspondiente método de referencia, mientras que otros pueden producir resultados con diferencias apreciables (Fornés, 2008; Norma técnica colombiana. NTC 5014, 2001). Por lo que dentro de la Cooperativa Colanta® se evaluó una metodología para el recuento del microorganismo probiótico *L. acidophilus* La3 en agar HHD, cómo éste es un método alternativo, el cuál brindaba una solución rápida al problema de diferenciación que se daba con el método de referencia (Agar MRS) en una matriz compleja como el Yogur Colanta®, se necesitó validarlo para dar resultados confiables en el reporte de probióticos en su producto final.

Se evaluaron los parámetros para la validación de la metodología para la cuantificación en agar HHD del microorganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* La3 en yogur semidescremado, los resultados que se obtuvieron para el límite de detección fue de 2 UFC/mL o g y el límite de cuantificación fue de 5 UFC/mL o g. No existe un criterio de aceptabilidad para estos límites, pues éstos se adaptan para cada validación y depende del método, el analito, el equipo de medición, las concentraciones, entre otras variables (Iso, 2017; Little, 2015), por lo que la comparación con otras validaciones se dificulta y carece de confiabilidad. El límite de detección es el número de microorganismos donde la probabilidad de un resultado negativo equivale al 5% bajo las condiciones experimentales establecidas y el límite de cuantificación es el número real más bajo de organismos que pueden ser medidos y cuantificados con una precisión y exactitud definidos, y es muy propio de cada método (de Benito et al., 2018; Domesle, Yang, Hammack, & Ge, 2018; Kogawa, Tomita, & Salgado, 2012; Lowther et al., 2018; Ortega González et al., 2013; Tuomela, Stanescu, & Krohn, 2005). Determinar los límites de lo que un ensayo puede cuantificar de manera confiable es un requisito de las autoridades reguladoras a nivel mundial (Little, 2015), por lo que se determina que el rango de lectura es de 5 a 200 unidades formadoras de colonia en placa de agar HHD, siendo este valor mucho más sensible que el método de referencia que utiliza Agar MRS, pues el recuento es preciso y exacto a partir de 15 UFC, como se indica en la NTC 5034:2002 (Norma técnica colombiana. NTC 5034, 2002).

Después de hallar los límites, se determinó la linealidad del método realizando diluciones intermedias del microorganismo *Lactobacillus acidophilus* ATTC 314 para obtener la gráfica lineal (Ver gráfica 1), donde se obtuvo una pendiente de 1.0016, siendo un valor aceptable, ya que el criterio de aceptabilidad es de 0.9 a 1.10, lo que indica que no hay

un error sistemático proporcional en el método que pudiese afectar los límites de decisión asociados a la concentración del microorganismo. En palabras simples, la concentración de *L. acidophilus* La3 determinado en agar HHD es directamente proporcional a la concentración real adicionada al yogur, lo que brinda resultados confiables a la hora de realizar el reporte de la concentración de este probiótico en el producto terminado de Colanta®. El intercepto fue de -0.0084, como es cercano a cero nos indica que no existen errores sistemáticos constantes. Es decir, que no existen errores asociados a fuentes que se puedan controlar, sino aleatorios (Fernández, 2015).

En el ensayo de linealidad se logró obtener un $R^2=0,9991$ (ver gráfica 1) valor muy cercano al valor teórico 1, lo que indica una alta correlación, por lo que existe una dependencia casi total o directa entre el valor matemático y el valor obtenido, cuando la señal o la concentración de *L. acidophilus* La3 aumenta la detección del medio también lo hace. Este coeficiente es altamente significativo para la evaluación de la linealidad de los métodos, así se evidencia en la investigación realizada por *Dafale N. et al 2015* quien desarrolló y validó un bioensayo microbiano para la cuantificación de levofloxacina en preparaciones farmacéuticas (Dafale, Semwal, Agarwal, Sharma, & Singh, 2015); esto también se indica en la investigación realizada por *Fiorentino et. al 2013* (Fiorentino, Corrêa, & Salgado, 2013) en Brasil, donde se tuvo en cuenta la regresión lineal ($R^2=0,9999$) para la evaluación de la linealidad de un método de difusión de agar simple para la dosificación de digluconato de clorhexidina (CHX-D) en una solución acuosa, siendo ese resultado altamente significativo para esa técnica. Resultados similares obtiene *Mendoza et. al 2014* (Rosa, 2014) en la validación a microescala del método de ensayo 4-aminoantipirina para cuantificar compuestos fenólicos en cultivos microbianos, donde demuestra que existe una dependencia lineal entre la concentración y la señal analítica en el intervalo evaluado con un R^2 de 0,9978. Otras investigaciones sobre validación de técnicas analíticas también mencionan la importancia de la correlación dada por el R^2 en temas de linealidad (Cazedey & Salgado, 2011; Christ et al., 2015; Dafale, Semwal, Rajput, & Singh, 2016; Fiorentino et al., 2013; Kogawa et al., 2012; Lemos et al., n.d.; Manfio, Agarrayua, Machado, & Schmidt, 2013; Ortega González et al., 2013; Tanaka et al., 2010; Tuomela et al., 2005). Esta prueba tuvo una proporción de ratio r_L del 1.9% que según la ISO 16297:2014 *Protocolo para la evaluación de métodos alternativos* (Em, 2014) debe ser menor del 5%, éste es un parámetro cuantitativo que determina si la tendencia observada es aceptable o no. Es decir, que no hay sesgos en los datos. Se obtuvieron unos residuales que si se observa en la gráfica 2, no superan el $0,05 \log_{10}$ aceptado para el tipo de microorganismos evaluados según lo describe la norma ISO/TR 13843:2000 "Water quality Guidance on validation of microbiological methods" que es $<0,5 \log_{10}$ (Agua, Para, Orientación, & La, 2003), por lo que no se evidencia una desviación considerable entre los datos obtenidos. Se toma como guía esta norma porque el agua puede considerarse cercana a la matriz evaluada por ser parte integral de los alimentos. Este criterio también se contempla en el capítulo 13 de la validación de métodos microbiológicos para alimentos de la AOAC (Brunelle, 2016). Los residuales también se tuvieron en cuenta en la validación realizada por *Mendoza et. al 2014* (Rosa, 2014), donde se reveló que los puntos están distribuidos al azar alrededor del eje X, indicando que la curva es realmente lineal hasta los $5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de fenol.

Para la comprobación de la linealidad se realizó un test t student (Tabla 6), donde al evaluar los resultados se acepta la hipótesis nula con un valor t calculado: $0,6733 < t_{crítico}: 2,4469$. Por lo tanto, se puede considerar que la prueba ensayada presentó linealidad, ya que los resultados microbiológicos cuantitativos (Recuentos) mostraron capacidad de generar resultados proporcionales a la concentración de microorganismos inicialmente inoculados en la muestra. De esta forma, la Cooperativa Colanta® garantizará recuentos de probióticos proporcionales a la cantidad real adicionada en el producto terminado, dentro de las concentraciones requeridas, evitando así errores en las cantidades reportadas en cuanto a recuperación del *L.acidophilus* La3 en yogur. Para *Fiorentino et. al 2013*, *Kogawa et. al 2012* y *Mendoza et. al 2014* (Fiorentino et al., 2013; Kogawa et al., 2012; Rosa, 2014) concluyen por medio de los resultados estadísticos, que no se presentan desviaciones de paralelismo o linealidad en los resultados obtenidos.

La determinación de la exactitud del método, expresada en Veracidad (Sesgo) y en porcentaje de recuperación, fue de importancia para la matriz evaluada, pues cuenta con muchos factores que influyen en la viabilidad de los probióticos en matrices como el yogur (pH, peróxido de hidrógeno, atmósfera de almacenamiento, concentración de metabolitos tales como ácido láctico y ácidos orgánicos, oxígeno disuelto, tampones tales como proteínas de suero, entre otros) (Talwalkar & Kailasapathy, 2004), y esto se complica aún más por la falta de una enumeración confiable y medios para estimar selectivamente los recuentos de *L. acidophilus* en los yogures comerciales de los cultivos iniciadores presentes en la matriz, lo que genera ciertas dudas respecto a la fiabilidad de los informes actuales sobre la poca supervivencia de bacterias probióticas en yogures (Ashraf & Shah, 2011).

Por lo anterior, se evaluó este atributo donde se obtuvo una recuperación del método del 94,8% en los niveles de carga evaluados para *L. acidophilus* La3 (ver Tabla 7), éste valor cumple el requisito normativo, puesto que la USP 30:2007 indica que debe ser mayor al 70% (Convention, 2007), se tuvo una desviación estándar de 0,994, un coeficiente de variación del 1,05% y un sesgo del 10,98%. Según la USP 30:2007 el sesgo no debe ser superior al 15%. En la investigación realizada por *Mendoza et. al 2014* (Rosa, 2014) se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 99,1% y 100,9% sugiriendo que el método de ensayo 4-aminoantipirina para cuantificar compuestos fenólicos en cultivos microbianos tiene una buena exactitud. Además, la tabla 8 comprueba que no existe variación estadísticamente significativa entre cada una de las réplicas obtenidas, y que la concentración del microorganismo no afecta la recuperación del método. Un estudio comparativo sobre los conteos en HHD y medios de referencia son descritos por *Camaschella et. al 1998* (Camaschella et al., 1998), donde se obtuvieron resultados muy bien correlacionados para las 4 especies evaluadas (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* y *bifidobacterias*). Allí, los valores de desviación estándar estaban muy cerca de los valores correspondientes de desviación estándar de la regresión, lo que mostró la similitud de los resultados con ambos métodos. El mismo autor concluye que los recuentos de HHD fueron leves, pero significativamente más altos que los de los medios de referencia para las 4

especies, y aunque el medio HHD no es selectivo, permitió en particular una mejor recuperación de *L. acidophilus* (+0.19 log) y bifidobacterias (+0.15 log). Esta investigación da un gran soporte a los resultados obtenidos en esta validación, ya que son los microorganismos presentes en la matriz láctea evaluada.

En las validaciones, por normatividad se evalúan los mismos parámetros (Abdelaziz, Elbanna, & Gamaleldeen, 2012; Boubetra, Nestour, Allaert, & Feinberg, 2011; Dafale et al., 2015; Fiorentino et al., 2013; Kogawa et al., 2012; Lemos et al., n.d.; Ortega González et al., 2013; Rosa, 2014), en éstas se ha determinado la importancia de los resultados obtenidos en cuanto a la veracidad y el porcentaje de recuperación de los métodos microbiológicos, cuando se trata de microorganismos específicos con importancia no sólo clínica, sino también sobre algún beneficio específico, para este caso, la dosis mínima para que un probiótico ejerza su beneficio en el consumidor, y que el consumidor pueda confiar en lo que dice la etiqueta. *Morovic 2016* (Morovic, Hibberd, Zabel, Barrangou, & Stahl, 2016) utilizó métodos moleculares para probar la hipótesis de que los productos contienen la lista cuantitativa y cualitativa de especies microbianas que detallan en las etiquetas. En su estudio encontró que 17 de 52 muestras (33%) estaban por debajo de la etiqueta de reclamación de unidades formadoras de colonias (UFC) antes de su fecha de vencimiento. Un esquema de PCR multiplexado mostró que sólo 30/52 (58%) de los productos contenían una clasificación correctamente etiquetada, con problemas que abarcaban la taxonomía incorrecta, las especies faltantes y las especies no etiquetadas.

Para la evaluación de inclusividad los resultados se describen en la tabla 9, si bien el medio de cultivo HHD no es un medio selectivo, éste permite la diferenciación macroscópica de las colonias (Ashraf & Shah, 2011), lo que no se puede lograr con el medio usado en el método convencional Agar MRS descrito en la NTC 5034:2002 (Norma técnica colombiana. NTC 5034, 2002), siendo el HHD un medio de cultivo diferencial que permite la comprobación de una o más características fisicoquímicas o bioquímicas de los microorganismos para su identificación (International Organization for Standardization, 2003), por contener un indicador de pH que ayuda a diferenciar visualmente los microorganismos heterofermentadores de los homofermentadores pertenecientes al grupo de bacterias ácido lácticas (BAL), que en su mayoría componen la matrices lácteas como el yogur.

Dado que los BAL homofermentativas producen más ácido a partir de una cantidad fija de fructosa que las heterofermentativas, se puede establecer una diferencia de pH mediante el cambio de color del medio, de azul a verde (durante el crecimiento de bacterias homofermentativas). Es así, como las especies son reconocibles por los diferentes colores, como fue observado por *McDonald 1987* (McDonald et al., 1987), y por la forma, apariencia y tamaño de las colonias. *Camaschella et. al 1998* (Camaschella et al., 1998) determinó la idoneidad del medio de agar HHD para la detección y la enumeración específica de *S.*

thermophilus, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* y bifidobacterias en la misma placa.

Para el microorganismo probiótico *L. acidophilus* la diferenciación respecto a los cultivos iniciadores de una matriz compleja como el yogur se da fácilmente (Ver tabla 10), pues la morfología es muy típica del microorganismo, son colonias irregulares en forma de coliflor de color verde salvia con el centro más oscuro, son homofermentadores por lo que el medio de cultivo vira a verde, y en el estereoscopio se observa un brillo metálico propio de dicha cepa. Lo que facilita la correcta identificación y recuento del probiótico, independiente de la experticia de las analistas que procesen las muestras, favoreciendo un adecuado reporte de las cantidades recuperadas del microorganismo en el yogur. Según la *Guía de aseguramiento de la calidad, valoración de medios de cultivo y validación microbiológica cualitativa para los laboratorios de microbiología de alimentos* del INVIMA (Ana Isabel Muñoz Cajiao, 2011), la productividad de un medio de cultivo debe ser mayor o igual a 3.5 en las pruebas ecométricas (índice de productividad ICA), en este ensayo, del 95,7% de las cepas que crecieron en el agar HHD, el 73,3% (33 cepas) presentó una buena productividad y el 26,7% (12 cepas) presentó un ICA inferior a 3.5, las cepas fueron en su mayoría pertenecientes a los géneros de *Enterococcus* y *Lactococcus*.

Al ser el yogur una matriz compleja se sembraron cepas que pueden estar de manera natural en el producto, como las bacterias ácido lácticas de *Streptococcus* spp. y otros Lactobacilos, también cepas contaminantes del grupo de los Coliformes como *Enterobacter aerogenes* y *E. coli*, hongos como la levadura *C. albicans*. Todas éstas crecieron en el medio, pero se diferencian del probiótico con facilidad, lo que favorece la identificación de una posible contaminación en la matriz, y evitando que de esta forma salga un producto sin las condiciones adecuadas de calidad e inocuidad. Como el yogur Colanta® puede tener otro tipo de probióticos del género *Bifidobacterium* spp. se sembró la cepa de *Bifidobacterium breve* ATCC15700, la cual presentó una morfología macroscópica de colonias puntiformes elevadas, con forma de gota de agua y bordes definidos, además al ser una cepa heterofermentativa el medio de cultivo HHD permanece azul, por lo que su diferenciación del también probiótico *L. acidophilus* se da de manera rápida y confiable (Camaschella et al., 1998). Esto es un punto importante cuando se trata de negociaciones especiales con clientes que solicitan pliegos específicos que requieran algún probiótico puntual, identificando a tiempo el microorganismo adicionado en el producto terminado, y evitando perder clientes por la adición incorrecta de los probióticos, o por no tener las herramientas necesarias para diferenciar estos dos probióticos con un mismo método. De esta forma, se facilita la diferenciación y se comprueba la pureza de las colonias, y al realizar pruebas bioquímicas se comprueba lo que se observa macroscópicamente.

En cuanto al parámetro de precisión del método expresado en repetibilidad y precisión intermedia, se determinó que el método de recuento en placa para probióticos en agar HHD es preciso, ya que los resultados de S_r (desviación estándar de repetibilidad) son menores que el S_R (desviación estándar de precisión intermedia) (ver tabla 11), y éstos no deben superar

la especificación de la USP del 15% y se tiene que la desviación estándar de repetibilidad y reproducibilidad son en promedio de 4% cumpliendo con la especificación. Los valores obtenidos para este atributo, son comparables con otras validaciones (Abdelaziz et al., 2012; Biesta-Peters, Jongenburger, de Boer, & Jacobs-Reitsma, 2018; Cazedey & Salgado, 2011; Christ et al., 2015; de Benito et al., 2018; Fiorentino et al., 2013; Kogawa et al., 2012; Lemos et al., n.d.; Lowther et al., 2018; Manfio et al., 2013; Ortega González et al., 2013; Tanaka et al., 2010; Tuomela et al., 2005), lo que confirma la capacidad del método para determinar la concentración de *L. acidophilus* La3 en yogur con precisión, independiente del analista que ejecute el método. La precisión del método está dada en coeficiente de variación (ver tabla 12), la cual está en el rango establecido en la USP de 2007 que es <15% en el rango alto y <35% en el rango bajo, por lo tanto el método es preciso.

En cuanto al análisis estadístico, el análisis de varianza de un factor permite comparar varios grupos en una variable cuantitativa. En este caso, la variable categórica o factor que define los grupos que se desean comparar se ve representada por el analista que realizó la siembra, mientras que la variable cuantitativa o dependiente que permite comparar los grupos está definida por la concentración del probiótico a evaluar.

Se trabajó las concentraciones del probiótico separadas, en carga alta (10^5 UFC/mL) media (10^6 UFC/mL) y baja (10^7 UFC/mL), sobre 3 analistas de manera independiente, cada analista hacía referencia a condiciones diferentes pero la misma matriz. A su vez, cada grupo estaba compuesto por un total de 30 muestras. De esta manera, se puede observar en las tablas ANOVA (Tablas 13, 14 y 15), los valores obtenidos por medio de la herramienta de análisis de datos de Excel.

El valor calculado para F en todos los casos presentados es menor que el valor crítico de F (Tablas 13, 14 y 15) por lo que finalmente, se da por hecho que la varianza de la carga del probiótico *L. acidophilus* en muestras de yogur no presenta diferencias estadísticamente significativas entre analistas, garantizando resultados confiables del recuento de probióticos independientemente del analista que procese las muestras.

Finalmente, la ISO 19036:2006 *Microbiology of food and animal feeding stuffs- Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations* (Specification, 2006) contempla estimar la incertidumbre con los datos de reproducibilidad, lo único que no se contempla es el sesgo, por lo que se multiplica por el factor (k) de 2 para contemplar la variable que no se tiene en cuenta, por lo cual se expande con un 95% de confianza. El enfoque global puede considerarse como un sistema de "caja negra", como se ilustra en la Figura 3, donde se identificaron las principales fuentes de incertidumbre del método de recuento en placa en agar HHD. Dicho diagrama puede ser útil para identificar las fuentes de incertidumbre que están cubiertas o no por el protocolo experimental elegido. El sesgo según esta ISO, no se tiene en cuenta en la estimación de la incertidumbre, dada la naturaleza empírica de las enumeraciones microbianas. En otras palabras, el procedimiento analítico determina directamente el resultado de la medición, por ejemplo, el número de unidades formadoras de colonias por unidad de muestra. Por lo tanto, en la práctica no es

posible determinar un valor verdadero, que se requiere para determinar el sesgo. Incluso cuando se utilizan materiales de referencia certificados o valores derivados de ensayos interlaboratorios, sólo se puede evaluar una parte del sesgo total (Specification, 2006). La incertidumbre en las mediciones es una indicación cuantitativa de la variabilidad analítica de los resultados. Consensos internacionales apoyan el uso de los datos de reproducibilidad y repetibilidad en la evaluación de la incertidumbre en la microbiología de los alimentos (Ortega González et al., 2013), y en la investigación realizada por *Hutchison et. al 2006* (HUTCHISON, WALTERS, MEAD, HOWELL, & ALLEN, 2006) determina la incertidumbre sólo de la precisión. Por las condiciones de siembra del ensayo, la incertidumbre de las tres analistas se agrupó, por lo que la desviación estándar de la precisión intermedia o incertidumbre combinada fue de 0.05 log₁₀ y la incertidumbre expandida fue de 0.106 log₁₀ (Ver tabla 17). De acuerdo a los resultados obtenidos en la estimación de la incertidumbre del método de recuento en placa agar HHD de *Lactobacillus acidophilus* La3 en yogur, la incertidumbre expandida del método es de ±1UFC/mL o g. Un ejemplo de la expresión de esta incertidumbre asociada al método sería 9x10⁶/UFCmL ± 1 UFC/mL de *L. acidophilus* La3. La incertidumbre del método será reportada en el informe de ensayo únicamente por solicitud expresa del cliente.

La desviación estándar de repetibilidad fue de 0.03 log₁₀. Ésta es menor que la incertidumbre combinada, lo que permite afirmar que el método es preciso. Desde el punto de vista microbiológico las diferencias no superan el 0.3 log₁₀, lo que no representa variación en el método.

Los resultados obtenidos en esta validación cumplen con los criterios normativos establecidos, una explicación para ello puede estar relacionada con el uso de procedimientos estandarizados que se ejecutan en todos los laboratorio de Colanta®, la experticia de las analistas que llevaron a cabo el método, evidenciada por las pruebas de rutina r y R (repetibilidad y reproducibilidad) con ensayos de aptitud a nivel internacional (LGC Standards, es una división del grupo LGC “Instituto Nacional de Reino Unido”, para mediciones químicas y bioanalíticas y un líder internacional en servicios de laboratorio, estándares de medición, materiales de referencia, genómica y mercados de pruebas de competencia www.lgcstandards.com), donde se comparan métodos y analistas de todo el mundo con matrices puntuales dependiendo del sector (Alimentos y bebidas, farmacéutico, ambiental, clínica y forense, entre otros); también el uso de equipos de punta en los laboratorio y el aseguramiento metrológico de los mismos, entre muchas otras razones.

De esta manera con la validación del método realizada en esta investigación, le da la confianza a la Cooperativa Colanta® de liberar productos con resultados confiables, precisos y veraces de probióticos en yogur, con las cantidades adecuadas, verificando la dosis mínima de 1x10⁶UFC/mL o g de probióticos en el producto y suministrándole a los consumidores la concentración declarado en la etiqueta.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Los resultados obtenidos en la validación del recuento en placa agar HHD de UFC (unidades formadoras de colonia) de bacterias probióticas de *Lactobacillus acidophilus* La3 cumple con los parámetros de validación extraídos de las diferentes especificaciones normativas, y tras la evaluación estadística de los resultados demostró que el método analítico es diferencial, genera una respuesta lineal, y la precisión y exactitud cumplen con los estándares microbiológicos. Por lo tanto el método puede ser empleado como método de análisis de rutina para la cuantificación de dicho microorganismo en el yogur semidescremado.

- En esta investigación se encontró que el método de recuento en placa agar HHD tiene una incertidumbre combinada de 0.05 log₁₀ y una incertidumbre expandida de 0.106 log₁₀ con un 95% de confianza, por lo cual al momento de la evaluación de la incertidumbre en el ensayo se debe aplicar al resultado para verificar el cumplimiento de la resolución que regula dicho recuento.

- Los resultados obtenidos en la precisión y exactitud son comprobados estadísticamente y se determinan que cumplen, por lo cual estos pueden usarse como especificaciones en el control de calidad del ensayo implementado de rutina.

- Se evidencia que el método analítico para recuento en placa agar HHD de UFC (unidades formadoras de colonia) de bacterias probióticas de *Lactobacillus acidophilus* La3 en yogur semidescremado tiene mejor desempeño que el método de referencia de agar MRS para esta matriz puesto que permite en la misma placa una clara diferenciación macroscópica del probiótico respecto a la microbiota acompañante, además cumple con su uso previsto de acuerdo a los criterios de aceptabilidad establecidos y se confirman las especificaciones del desempeño, garantizando que no existen errores estadísticamente significativos.

- De este trabajo, surge la necesidad de evaluar la capacidad probiótica de las cepas adicionadas al yogur Colanta®, si bien el proveedor SACCO-CSL envía cada lote con su respectivo certificado de calidad, es importante que la Cooperativa corrobore dicha información para darle un soporte más confiable a los consumidores sobre el beneficio esperado al consumir diariamente un microorganismo probiótico del yogur Colanta®.

- Igualmente, realizar la validación del método de recuento en placa en agar HHD con el probiótico *Bifidobacterium* spp.

7. REFERENCIAS

Abdelaziz, A. A., Elbanna, T. E., & Gamaleldeen, N. M. (2012). Validated microbiological and HPLC methods for the determination of moxifloxacin in Pharmaceutical preparations and human plasma. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1291–1301. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400008>

Agua, C. D. E. L., Para, G., Orientación, L. A., & La, A. D. E. (2003). Calidad del agua. guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológicos.

Ana Isabel Muñoz Cajiao, L. A. O. C. (2011). *Guía de aseguramiento de la calidad, valoración de medios de cultivo y validación microbiológica cualitativa para los laboratorios de microbiología de alimentos*. (2011 Invima, Ed.). Colombia: Colombia. Ministerio de la Protección Social. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima).

AOAC. (2012). AOAC® PRE-PUBLICATION DRAFT AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces EFFECTIVE DATE FOR USE: FEBRUARY 24, 2012 AOAC® Guidelines for Validation of Microbiological Methods. *Consensus by AOAC Methods Committee on Microbiology on Sept, 18(12)*, 1–46. Retrieved from http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/AOAC_Validation_Guidelines_for_Food_Microbiology-Prepub_version.pdf

Arias Palacios, J., Ortiz Gómez, D. S., & González Acero, A. (2013). Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado, elaborado en una industria farmacéutica. *Revista Cubana de Farmacia*, 47(2), 178–184.

Ariza Tirado, C. A. (2015). Estandarización y verificación de los métodos analíticos alternativos usados en calidad en la Compañía productos Alimenticios Doria S.A, 1, 1–118. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Ashraf, R., & Shah, N. P. (2011). Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 94–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.008>

Asociación, I., Cárnicas, D. I., & López, A. M. (2013). Máster en Biotecnología del Medioambiente y la “ Validación y cálculo de incertidumbre para la determinación de microorganismos indicadores , mediante microbiología clásica y NMP automatizado , en matrices cárnicas .”

Axelsson, L., & Ahrné, S. (2000). Lactic acid bacteria. *Applied Microbial Systematics*, 367–388.

Biesta-Peters, E. G., Jongenburger, I., de Boer, E., & Jacobs-Reitsma, W. F. (2018). Validation by interlaboratory trials of EN ISO 10272 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method. *International Journal of Food Microbiology*, (May), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.007>

Bigliardi, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.03.006>

Boubetra, A., Nestour, F. Le, Allaert, C., & Feinberg, M. (2011). Validation of alternative methods for the analysis of drinking water and their application to *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3360–3367. <https://doi.org/10.1128/AEM.00020-11>

Brunelle, S. (2016). *Chapter 13 - Validation of microbiological methods for food. Statistical Aspects of the Microbiological Examination of Foods, 3rd* (Third Edit). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803973-1/00013-9>

Caillard, R., & Lapointe, N. (2017). In vitro gastric survival of commercially available probiotic strains and oral dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 519(1–2), 125–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.019>

Calidad, C. D. E., & Cartagena, D. E. A. D. E. (2010). VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES Y *E. coli* POR EL MÉTODO FILTRACIÓN DE MEMBRANA EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DE AGUAS DE CARTAGENA S.A E.S.P., 2(1), 21–30.

Camaró-sala, M. L., Martínez-garcía, R., Olmos-martínez, P., Catalá-cuenca, V., Dolores, M., & Gimeno-cardona, C. (2015). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos, 33(7), 2013–2018.

CamascHELLA, P., MIGNOT, O., Pirovano-", F., & Sozzi, T. (1998). Method for differentiated enumeration of mixed cultures of thermophilic lactic acid bacteria and bifidobacteria by using only one culture medium. *Lait*, 78, 461–467. <https://doi.org/10.1051/lait:1998444>

Carrillo, E., & Lozano, A. (2008). Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar chromocult. *Pontificia Universidad Javeriana*, 1–82. Retrieved from <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis203.pdf>

Cazedey, E. C. L., & Salgado, H. R. N. (2011). Development and validation of a microbiological agar assay for determination of orbifloxacin in pharmaceutical preparations. *Pharmaceutics*, 3(3), 572–581. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3030572>

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology*, 35(1), 1–27. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01222-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01222-6)

Christ, A. P., Machado, M. S., Ribas, K. G., Schwarzbald, A. V., da Silva, C. de B., & Adams, A. I. H. (2015). A fully validated microbiological assay for daptomycin injection and comparison to HPLC method. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(4), 775–783. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502015000400003>

Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., & Vernoux, J. P. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Le Lait*, 83(4), 269–306. <https://doi.org/10.1051/lait>

Convention, T. U. S. P. (2007). 2007 Usp 30 Nf 25. *Farmacopea de Los Estados Unidos de América: Formulario Nacional*, 2, 1464.

Dafale, N. A., Semwal, U. P., Agarwal, P. K., Sharma, P., & Singh, G. N. (2015). Development and validation of microbial bioassay for quantification of Levofloxacin in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(1), 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.07.007>

Dafale, N. A., Semwal, U. P., Rajput, R. K., & Singh, G. N. (2016). Selection of appropriate analytical tools to determine the potency and bioactivity of antibiotics and antibiotic resistance. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(4), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.05.006>

de Benito, A., Gnanou Besse, N., Desforges, I., Gerten, B., Ruiz, B., & Tomás, D. (2018). Validation of standard method EN ISO 22964:2017 — Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. *International Journal of Food Microbiology*, (January), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.025>

Desempeño, D. E. L. (2015). Instituto Nacional De Salud Dirección De Redes En Salud Pública Subdirección Laboratorio Nacional De Referencia, 1–54.

Domesle, K. J., Yang, Q., Hammack, T. S., & Ge, B. (2018). Validation of a *Salmonella* loop-mediated isothermal amplification assay in animal food. *International Journal of Food Microbiology*, 264(October 2017), 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.020>

Douglas, L. C., & Sanders, M. E. (2008). Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. *Journal of the American Dietetic Association*, 108(3), 510–521.

<https://doi.org/10.1016/j.jada.2007.12.009>

Em, D. (2014). Scanned by CamScanner. *ISO 16297-, Norma, Versión in.*

FANEGAS, M.-F., ZAPATA, A.-L., ZULETA, M.-D., BURITICÁ, M.-G., AGUDELO, S.-O., & VALENCIA, J.-S. (2017). Capacidad Antimicrobiana De Bacterias Ácido Lácticas Autóctonas Aisladas De Queso Doble Crema Y Quesillo Colombiano. *Antimicrobial Capacity of Native Lactic Acid Bacteria Isolated From Double Cream Cheese and Colombian Quesillo.*, 15(1), 45–55. Retrieved from [http://10.0.72.252/BSAA\(15\)45-55%0Ahttp://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=124397768&lang=es&site=ehost-live](http://10.0.72.252/BSAA(15)45-55%0Ahttp://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=124397768&lang=es&site=ehost-live)

FAO, E., & OMS, E. (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Estudios FAO Alimentación Y Nutrición*, 85, 52. Retrieved from <file:///C:/Users/Acer/Documents/paty/homework1/PROBIOTICOS OPS 2006.pdf>

Fernández, M. P. F. (2015). Desarrollo de Métodos Rápidos para la Detección de *Alicyclobacillus* spp. en Materia Prima Destinada a la Elaboración de Bebidas y Zumos de Frutas, 321.

Fiorentino, F. A. M., Corrêa, M. A., & Salgado, H. R. N. (2013). Development and validation of a microbiological assay for determination of chlorhexidine digluconate in aqueous solution. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(2), 351–358. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000200017>

Fornés, D. T. (2008). Validación de métodos microbiológicos alternativos. *Ainia, VII Worksh*, 8.

Gilliland, S. E. (1999). *Lactobacillus, Bifidobacterium*, 1–15.

HUTCHISON, M. L., WALTERS, L. D., MEAD, G. C., HOWELL, M., & ALLEN, V. M. (2006). An Assessment of Sampling Methods and Microbiological Hygiene Indicators for Process Verification in Poultry Slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, 69(1), 145–153. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.1.145>

Hütt, P., Shchepetova, J., Lõivukene, K., Kullisaar, T., & Mikelsaar, M. (2006). Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1324–1332. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02857.x>

Illanes, A. (2015). Alimentos funcionales y biotecnología. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 5–8. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50997>

International Organization for Standardization. (2003). ISO 11133 Microbiology of

food, animal feed and water- Preparation, production, storage and performance testing of culture media. *International Organization for Standardization, 2002*(Define los términos relacionados con el aseguramiento de calidad de los medios de cultivo y especifica los requerimientos para la preparación de medios de cultivo.), 16.

International Standard. (1994). ISO, "ISO 5725-2 – Accuracy (trueness and precision) of Measurements Methods and Results – Part 2: Basic Method for the Determination of the Repeatability and Reproducibility of a Standard Measurement Method.

Iso, U. (2017). UNE-EN ISO 16140-2:2016 Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia, 78.

Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., & Mercenier, A. (2010). Application of probiotics in food products-challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology, 21*(2), 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.009>

Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., & Axelsson, L. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology, 153*(1–2), 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.020>

Kandylis, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M., & Koutinas, A. A. (2016). Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science, 7*, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.012>

Kogawa, A. C., Tomita, L. K., & Salgado, H. R. N. (2012). Development and validation of a stability-indicative turbidimetric assay to determine the potency of doxycycline hyclate in tablets. *International Journal of Microbiology Research, 4*(8), 316–321.

Lemos, A. A. De, Marin, V. A., As, R., Origem, D. De, & Doa, A. (n.d.). Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares Validation of qualitative alternative methods in the detection of food-born pathogens, 1073–1083.

Little, T. A. (2015). Method Validation Essentials, Limit of Blank, Limit of Detection, and Limit of Quantitation. *BioPharm International, 28*(4), 48–51.

Lowther, J. A., Bosch, A., Butot, S., Ollivier, J., Mäde, D., Rutjes, S. A., ... Leclercq, A. (2018). Validation of ISO method 15216 part 1 – Quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. *International Journal of Food Microbiology, (November)*, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.014>

Manfio, M. L., Agarrayua, D. A., Machado, J. C., & Schmidt, C. A. (2013). A fully validated microbiological assay to evaluate the potency of ceftriaxone sodium. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 49*(4), 753–762. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000400015>

Mcdonald, L. C., Mcfeeters, R. F., Daeschel, M. A., Fleming, H. P., Carolina, N., Carolina, N., & Carolina, N. (1987). NOTES A Differential Medium for the Enumeration of Homofermentative and Heterofermentative Lactic Acid Bacteriat, *53*(6), 1382–1384.

Microbiological, A., & Validation, M. (2018). Peer Reviewed : Microbiology, (3), 1–14.

Ministerio de la Protección Social. (2009). Republica de Colombia, *1986*(1), 1–121.

Ministerio Protección, C. (2011). Resolucion 333: Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos de rotulado o etiquetado nutricional que deben cumplir los alimentos envasados para consumo humano, *2011*, 56.

Morovic, W., Hibberd, A. A., Zabel, B., Barrangou, R., & Stahl, B. (2016). Genotyping by PCR and High-Throughput Sequencing of Commercial Probiotic Products Reveals Composition Biases. *Frontiers in Microbiology*, *7*(November), 1747. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01747>

Murphy, S. C. (2009). Dairy Foods Science Notes. *Food Science*, 14853.

Norma técnica colombiana. NTC 4092. (2009). Microbiología De Alimentos Y Productos Para Alimentación Animal. Requisitos Generales Y Directrices Para Análisis Microbiológicos, (571).

Norma técnica colombiana. NTC 5014. (2001). Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Protocolo para la validación de métodos alternos. *Norma Técnica Colombiana*.

Norma técnica colombiana. NTC 5034. (2002). 2002-02-20 Microbiología de Alimentos y Alimentos para animales. Método Horizontal para el recuento de Bacterias mesofílicas de ácido láctico. Técnica de recuento de colonias a 30°C.

OAA. (2013). Guia para la validación de métodos microbiológicos. *Organismo Argentino de Acreditación*, *1*, 1–17.

Olagnero, G., Abad, a, & Bendersky, S. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, *14*. <https://doi.org/0328-1310>

Ordoñez Parra, M. A., & Rojas Salazar, D. M. (2007). Diseño y Elaboracion de una Guia Prelimiar para la Validación de Métodos Microbiologicos Estándar, 1–68.

Organización Mundial de la Salud. (2011). Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. *Guías Mundiales de La WGO Probióticos Y Prebióticos*, 29.

Ortega González, M., Rodríguez Martínez, C. C., & Zhurbenko, C. R. (2013).

Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. *Revista Cubana de Higiene Y Epidemiología*, 51(1), 111–121.

Padilla, J. E. (2007). VALIDACIÓN SECUNDARIA DEL MÉTODO DE RECUENTO EN PLACA EN SUPERFICIE DE *Bacillus cereus* Y *Staphylococcus aureus* EN MUESTRAS DE ALIMENTOS EN UN LABORATORIO DE REFERENCIA. *Pontificia Universidad Javeriana*, 109. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Paez, J. (2008). Validación secundaria del método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales y. *Universidad Javeriana*.

Patrick, O. M. (2012). Lactic acid bacteria in health and disease. *Rwanda Journal of Health Sciences*, 1(1), 39–50. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0_5

Qualities, N. (2002). Manufacture of Fermented Lactic Beverages Containing Probiotic Cultures. *Journal of Food Science*, 67(6), 2336–2341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09550.x>

Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food Research International*, 49(2), 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.007>

Rojas-Castro, W. N., Chacón-Villalobos, A., & Pineda-Castro, M. L. (2007). Características del yogurt batido de fresa derivadas de diferentes proporciones de leche de vaca y cabra. *Agronomía Mesoamericana*, 18(2), 221–237.

Rosa, M. (2014). Redalyc. Validación a microescala del método de ensayo 4-aminoantipirina para cuantificar compuestos fenólicos en cultivos microbianos, XXVI.

Salva, S., Merino, M. C., Agüero, G., Gruppi, A., & Alvarez, S. (2012). Dietary supplementation with probiotics improves hematopoiesis in malnourished mice. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031171>

Salva, S., Nuñez, M., Villena, J., Ramón, A., Font, G., & Alvarez, S. (2011). Development of a fermented goats' milk containing *Lactobacillus rhamnosus*: In vivo study of health benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(13), 2355–2362. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4467>

Sánchez, J. L. (2005). Situación de la validación de los ensayos microbiológicos en los laboratorios., (Internet), 569–575.

Scotter, S. L., Langton, S., Lombard, B., Lahellec, C., Schulten, S., Nagelkerke, N., ... Rollier, P. (2001). Validation of ISO method 11290. Part 2. Enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 70(1–2), 121–129.

[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00530-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00530-X)

Senaka Ranadheera, C., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food Chemistry*, *135*(3), 1411–1418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.025>

Soler León, J. P. (2006). Validación Secundaria Del Método De Número Más Probable Y Recuento En Placa Profunda Para Coliformes Totales Y Fecales En Muestras De Alimentos Basada En La Norma ISO NTC 17025, 1–81. Retrieved from <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis273.pdf>

Song, D., Ibrahim, S., & Hayek, S. (2012). Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. *Probiotics*, 3–36. <https://doi.org/10.5772/50121>

Specification, T. (2006). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs — Guidelines for the Estimation of Measurement Uncertainty for Quantitative Determinations. ISO/TS 19036. *Order A Journal On The Theory Of Ordered Sets And Its Applications*, 2002.

Sutula, J., Coulthwaite, L., & Verran, J. (2012). Culture media for differential isolation of *Lactobacillus casei* Shirota from oral samples. *Journal of Microbiological Methods*, *90*(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.03.015>

Talwalkar, a, & Kailasapathy, K. (2004). A Review of Oxygen Toxicity in Probiotic Yogurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *3*(3), 117–124. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00061.x>

Tanaka, Y., Takahashi, H., Imai, A., Asao, T., Kozaki, S., Igimi, S., & Kimura, B. (2010). Reconsideration of flexibility in verifying rapid alternative food microbiological methods. *Food Control*, *21*(7), 1075–1079. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.01.004>

Tijerina Rodríguez Laura Esther. (2014). Validación de un método basado en filtración por membrana para la detección de patógenos bacterianos en melón, *Cucumis melo* (L., 1753) y Chile jalapeño, *Capsicum annuum* (L., 1753).

Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, *9*(1), 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>

Tuomela, M., Stanescu, I., & Krohn, K. (2005). Validation overview of bio-analytical methods. *Gene Therapy*, *12*, S131. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3302627>

Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2008). Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, *18*(7), 714–728. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.004>

Veterinarias, E. D. E. C. (2015). VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella* spp . EN MATRICES DE ALIMENTOS Víctor Hugo Riquelme Retamal DETECCIÓN DE *Salmonella* spp . EN MATRICES DE ALIMENTOS.

Villena, J., Salva, S., Núñez, M., Corzo, J., Tolaba, R., Faedda, J., ... Alvarez, S. (2012). Beneficial lactobacilli for improving respiratory defenses: The case of *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. *Lactobacillus: Classification, Uses and Health Implications*, 223–240. <https://doi.org/10.1177/0160017604266026>


Villena, J., Salva, S., Núñez, M., Corzo, J., Tolaba, R., Faedda, J., ... Alvarez, S. (2012). Probiotics for Everyone! The Novel Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 and the Beginning of Social Probiotic Programs in Argentina. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 1, 189–198.

Wang, K. Y., Li, S. N., Liu, C. S., Perng, D. S., Su, Y. C., Wu, D. C., ... Wang, W. M. (2004). Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(3), 737–741. <https://doi.org/80/3/737> [pii]

Wohlgemuth, S., Loh, G., & Blaut, M. (2010). Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.003>

ANEXOS

ANEXO 1. Ficha técnica cultivo LACID (*Lactobacillus acidophilus* La3)

<p>CSL Starter Cultures www.csl.it info@cslitalia.it</p>		 <p>CENTRO SPERIMENTALE DEL LATTE</p>	
PRODUCT DESCRIPTION			
LACID			
Description		Packaging size	
Freeze-dried concentrated culture, for direct vat inoculation of milk and milk bases. Culture of <i>Lactobacillus acidophilus</i>		4 Doses Different dosage if required	
Composition		Packaging	
Lactobacillus acidophilus		Three-layer thick pouches (polyethylene, aluminium-polyester) The following information is printed on each pouch: Product name Pack size Dosage Batch number Best before	
Rotations		Shipment	
Not available		Box containing 50 pouches each	
Main applications		Properties	
Fermented milk and Milk food products.		LACID is used to produce a mild fermented milk with low post-acidification during cold storage. LACID provides precise and reproducible process time	
Dosage		GMO status:	
Recommended inoculation rate: 4 DOSES/1000 L		LACID culture does not contain GMOs (Genetically Modified Organisms)	
Instructions for use		Kosher status:	
Remove the cultures from cool room just prior to use. Add it directly to the manufacturing milk as soon as agitation blades of the vat are covered with milk. Important recommendations: Avoid foam formation and air incorporation in the milk. Prolonged exposure at room temperature will reduce performances. Do not use the culture if appearing as a solid mass.		LACID is Kosher approved	
Temperature		Halal status:	
The recommended inoculation temperature depends on the application in which the culture is used. For more information, please contact the CSL's Technical Staff		LACID is Halal approved	
		Storage - Shelf life	
		If stored at a temperature $\leq +8^{\circ}\text{C}$, shelf life is 18 months from production date. If stored at a temperature $\leq -16^{\circ}\text{C}$, shelf life is 24 months from production date.	
Page 1 / 2		CSL 01-12 rev 8	

LACID

SPECIFICATION

CONCENTRATION AT LEAST
 3×10^{12} c.f.u / 4 doses

Microbiological specifications

	Standard values	Methods and References	
Enterobacteriaceae	<10 cfu/g	CSL SOP-CQ 105	ISO 21528-2
Enterococci	<1000 cfu/g	CSL SOP-CQ 103	
Yeasts and Moulds	<10 cfu/g	CSL SOP-CQ 099	ISO 5611
<i>Staphylococcus aureus</i> *	essente-absent-absence/g	ISO 8833-2	
<i>Salmonella</i> spp.*	essente-absent-absence/25g	ISO 6579	
<i>Listeria monocytogenes</i> *	essente-absent-absence/25g	ISO 11296-1	

*: Analyses carried out on a regular basis

List of allergens



DIR 2007/68/CEE

Allergen	Present	Absent
Milk and products thereof	X	
Eggs and products thereof		X
Peanuts and products thereof		X
Soybeans and products thereof		X
Cereals containing gluten and products thereof		X
Mustard and products thereof		X
Sulphur dioxide and sulphites		X
Celery and products thereof		X
Fish, crustaceans, molluscs thereof		X
Seesame seeds and products thereof		X
Nuts i.e. almond, hazelnut, walnut, etc and products thereof		X
Lupin and products thereof		X

ANEXO 2. Trazabilidad metrológica de equipos utilizados para la validación

Equipo	Certificado
Estufa de incubación (Mettler)	4385 M
Pipeta Piccus (02L05300200-45) (Sartorius)	3662 M.V
Pipeta Piccus (02L05300200-55) (Sartorius)	CCLEC-ASIU-3013
Balanza Analítica (Toledo)	9989 M
Termohigrómetro	CFT2600EG0
Autoclave horizontal (Centricol)	3807-170816 POI
Dilumat Expert (AES™)	10644774

Certificado 4385 M: Estufa de incubación (Mettmert)



METROLOGIC COLOMBIA S.A.S.		
<i>Certificado de Calibración</i> <i>Laboratorio de Temperatura</i>		
		
CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN N° 4385 M Página 1 de 4		
SOLICITANTE	: COOPERATIVA COLANTA	
DIRECCIÓN	: AVENIDA 49 N° 43 - 282 BARRIO MIRA FLORES SAN PÉDRO DE LOS MILAGROS	
INSTRUMENTO	: ESTUFA	
FABRICANTE	: MEMMERT	
MODELO	: LJE 600	
NÚMERO DE SERIE	: C602.0053	
CÓDIGO	: 0007059	
RANGO DE CALIBRACIÓN	: 35 °C	
RANGO DE MEDICIÓN	: Max 220 °C	
RESOLUCIÓN	: 1 °C	
FECHA DE RECEPCIÓN	: 2017-10-26	
FECHA DE CALIBRACIÓN	: 2017-10-26	
SITIO DE CALIBRACIÓN	: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	

1. MÉTODO DE CALIBRACIÓN
 Para la calibración se empleó el método de comparación directa con un patrón de referencia.
 Se tomó como referencia el procedimiento DKD-R 5-7 "Calibration of Climatic Chambers" edición 02/2009.

2 INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN
 La incertidumbre reportada se ha determinado multiplicando la incertidumbre estándar combinada por el factor de cobertura $k = 2$, con el cual se logra un nivel de confianza de aproximadamente 95%.
 La incertidumbre de medición expandida, fue calculada de los componentes de incertidumbre de medida del patrón de referencia, del procedimiento de calibración, de la resolución del instrumento de prueba, de la estabilidad y la uniformidad del medio generador.
 La incertidumbre indicada no incluye una estimación de variaciones a largo plazo.

3. TRAZABILIDAD
 El certificado de calibración documenta la trazabilidad a los patrones utilizados en estas mediciones, los cuales son trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI) y la escala internacional de temperatura de 1990, ITS-90 a través del NIST.
 El usuario está obligado a calibrar el instrumento a intervalos apropiados.

FIRMAS AUTORIZADAS:

 Ing. Jhon Harvey Muñoz Calibrado por:	 Tec. Julián Felipe Mora Autorizado por:
---	--

Este certificado (informe/reporte) expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. No podrá ser reproducido total o parcialmente, excepto cuando se hayan obtenido previamente permiso por escrito del laboratorio que lo emite.
 Los resultados contenidos en el presente certificado (informe/reporte) se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones. El laboratorio que lo emite no se hace responsable de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados.

RGM Lab 03 A / aprobado 2017-05-10

CALL: Carrera 32A # 10A - 97 B/ Coleseguros - Cel.: 321 701 54 20 - TELEFAX: 334 1111 - email: cali@metrologicolombia.com
 MEDELLIN: Calle 60 Sur # 44 - 51 Sabaneta - Antioquia - Cel.: 321 701 54 18 - email: medellin@metrologicolombia.com
www.metrologicolombia.com

METROLOGIC COLOMBIA S.A.S.

Certificado de Calibración

Laboratorio de Temperatura



CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN N° 4385 M

Página 2 de 4

4. CONDICIONES AMBIENTALES

Las condiciones ambientales durante la calibración del instrumento fueron:

Temperatura Inicial : 20,5 °C ± 0,26 °C Temperatura Final : 20,8 °C ± 0,26 °C
 Humedad relativa Inicial : 59,9 % hr ± 1,4 % hr Humedad relativa Final : 63,2 % hr ± 1,4 % hr

5 IDENTIFICACIÓN DEL PATRÓN

Los patrones utilizados en la calibración fueron:

DESCRIPCIÓN	CERTIFICADO N°	CALIBRADO POR
TERMOPAR TIPO K EN INDICADOR DIGITAL	N° 3440 M - N° 3441 M - N° 3442 M - N° 3443 M - N° 3444 M - N° 3445 M - N° 3446 M - N° 3447 M - N° 3448 M	METROLOGIC COLOMBIA

6. RESULTADOS DE LA CALIBRACIÓN

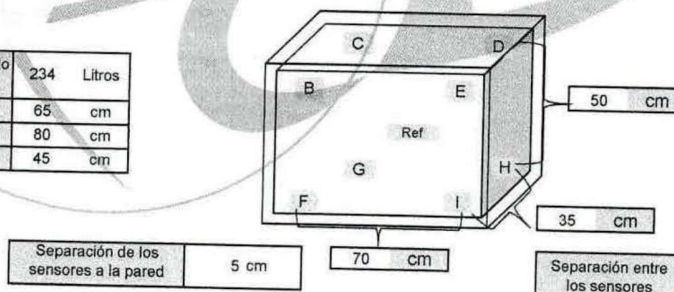
Los resultados de calibración indican el valor promedio del patrón, indicación del instrumento de prueba, la corrección aplicada a la temperatura evaluada y la incertidumbre de medición.

6.1 TABLA DE RESULTADOS

Temperatura nominal °C	Indicación promedio patrón °C	Indicación promedio prueba °C	Corrección a la indicación °C	Incertidumbre °C
35	33,2	35	-1,8	± 0,84

NOTA: Temperatura corregida = Temperatura indicada + Corrección a la indicación

Volumen interno aproximado (Volumen Util):	234 Litros
Altura Interna	65 cm
Ancho Interno	80 cm
Profundidad	45 cm



CALI: Carrera 32A # 10A - 97 B/ Colseguros - Cel.: 321 701 54 20 - TELEFAX: 334 1111 - email: cali@metrologiccolombia.com
 MEDELLIN: Calle 60 Sur # 44 - 51 Sabaneta - Antioquia - Cel.: 321 701 54 18 - email: medellin@metrologiccolombia.com
www.metrologiccolombia.com

METROLOGIC COLOMBIA S.A.S.

Certificado de Calibración

Laboratorio de Temperatura



CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN N° 4385 M
Página 3 de 4

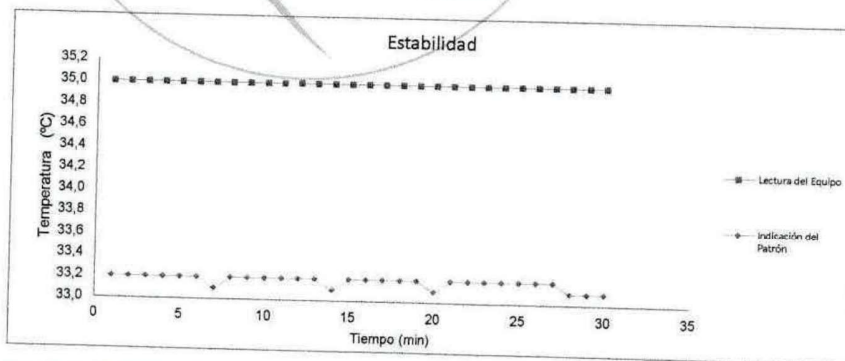
6.2 RESULTADOS DE PRUEBA DE UNIFORMIDAD Y ESTABILIDAD A 35 °C

Temp °C	Pos ref N° 3440 M °C	Pos B N° 3441 M °C	Pos C N° 3442 M °C	Pos D N° 3443 M °C	Pos E N° 3444 M °C	Pos F N° 3445 M °C	Pos G N° 3446 M °C	Pos H N° 3447 M °C	Pos I N° 3448 M °C
35	33,2	33,3	33,5	33,3	33,5	33,4	33,6	33,5	33,5
Diferencia (°C)		0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,4	0,3	0,3
Diferencia máxima		0,40 °C							

La uniformidad se determina como: $Uni \leq \text{Max} (\text{Pos ref} - \text{Pos X})$, siendo la Pos X, las posiciones de la Pos B a Pos I.

Estabilidad a 35 °C						
Temperatura evaluada	Tiempo min	Patrón °C	Prueba °C	Tiempo min	Patrón °C	Prueba °C
35	1	33,2	35	16	33,2	35
	2	33,2	35	17	33,2	35
	3	33,2	35	18	33,2	35
	4	33,2	35	19	33,2	35
	5	33,2	35	20	33,1	35
	6	33,2	35	21	33,2	35
	7	33,1	35	22	33,2	35
	8	33,2	35	23	33,2	35
	9	33,2	35	24	33,2	35
	10	33,2	35	25	33,2	35
	11	33,2	35	26	33,2	35
	12	33,2	35	27	33,2	35
	13	33,2	35	28	33,1	35
	14	33,1	35	29	33,1	35
	15	33,2	35	30	33,1	35
Min		33,1	35,0	Promedio	33,18	35,00
Max		33,2	35,0	Estabilidad	0,08	°C

La Estabilidad se determina como: $Est \leq \text{Max} (T_p - T_i)$, siendo la T_p el promedio de las lecturas del patrón y T_i las lecturas del patrón desde el minuto 1 al minuto 30.



CALI: Carrera 32A # 10A - 97 B/ Colseguros - Cel.: 321 701 54 20 - TELEFAX: 334 1111 - email: cali@metrologiccolombia.com
 MEDELLIN: Calle 60 Sur # 44 - 51 Sabaneta - Antioquia - Cel.: 321 701 54 18 - email: medellin@metrologiccolombia.com
www.metrologiccolombia.com

METROLOGIC COLOMBIA S.A.S.

Certificado de Calibración
Laboratorio de Temperatura



CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN N° 4385 M
Página 4 de 4

7. OBSERVACIONES

1. La estampilla de calibración fue adherida al instrumento.
2. Al valor indicado por el instrumento se le suma el factor de corrección para obtener la temperatura verdadera.
3. El equipo no cuenta con sistema de recirculación forzada.
4. La calibración se realizó bajo el método A, sin carga.




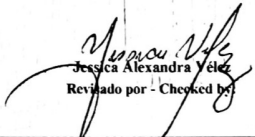
FECHA DE EXPEDICIÓN 2017-10-27

FM LAB T02 Revisión N° 10 / aprobado 2017-06-10

FIN DEL CERTIFICADO

CALI: Carrera 32A # 10A - 97 B/ Colseguros - Cel.: 321 701 54 20 - TELEFAX: 334 1111 - email: cali@metrologiccolombia.com
MEDELLIN: Calle 60 Sur # 44 - 51 Sabaneta - Antioquia - Cel.: 321 701 54 18 - email: medellin@metrologiccolombia.com
www.metrologiccolombia.com

Certificado 3662 M.V: Pipeta Piccus (02L05300200-45) (Sartorius)

Certificado de Calibración	
<i>Certificate of Calibration</i>	
 Laboratorio de Metrología	 ACREDITADO ONAC <small>ORGANISMO NACIONAL DE Acreditación de Colombia</small> ISO/IEC 17025:2005 12-LAC-048
Número:	3662 M.V
<i>Number</i>	
LABORATORIO DE METROLOGÍA DETECTO DE COLOMBIA LTDA Detecto de Colombia Ltda. Metrologie Lab. ÁREA DE VOLUMEN Volume Area	
INSTRUMENTO	PIPETA A PISTÓN
<i>Instrument</i>	
FABRICANTE	SARTORIUS
<i>Manufacturer</i>	
MODELO	PICUS
<i>Model</i>	
NÚMERO DE SERIE	16020089
<i>Serial Number</i>	
RANGO DE MEDICIÓN	50 µL a 1000 µL
<i>measuring range</i>	
SOLICITANTE	COLANTA
<i>Customer</i>	
DIRECCION DEL SOLICITANTE	AVENIDA 49 # 43 - 282 SAN PEDRO
<i>Customer address</i>	
FECHA RECEPCIÓN INSTRUMENTO	2017 -12 -18
<i>Instrument reception date</i>	
FECHA DE CALIBRACIÓN	2017 -12 -20
<i>Date of calibration</i>	
NÚMERO DE PAGINAS DEL CERTIFICADO INCLUYENDO ANEXOS	Cuatro (4)
<i>Number of pages of this certificate and documents attached</i>	
FIRMA(S) AUTORIZADA(S)	
<i>Authorized signature (s).</i>	
 Rafael David Martinez Calibrado por - Calibrated by:	 Jessica Alexandra Vélez Revisado por - Checked by:
<p>Este certificado expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. No podrá ser reproducido total o parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del laboratorio que lo emite.</p> <p><i>This certificate is an accurate report of the performed measurements. This certificate may not be totally or partially reproduced, except with the written permission of the issuing laboratory.</i></p> <p>Los resultados contenidos en el presente certificado se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones. El laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados.</p> <p><i>The results of this certificate refer to the time and conditions when the measurements were made. The issuing laboratory assumes no responsibility for damages resulting from improper use of the calibrated instruments.</i></p> <p>Bogotá D.C. Calle 91 No. 49 A-24 B/. La Castellana PBX: 634 8182 Fax: 634 8173 E-mail: bogota@detectedecolombia.com Call Calle 5B4 No. 38-75 B/. San Fernando - PBX: 558 6060 Fax: 558 6161 E-mail: call@detectedecolombia.com Medellin Calle 60 Sur No. 44-51 Sabaneta - Antioquia PBX: 444 1490 E-mail: medellin@detectedecolombia.com www.detectedecolombia.com</p>	

ACREDITADO ISO/IEC 17025:2005

12-LAC-048

LABORATORIO DE METROLOGÍA DETECTO DE COLOMBIA LTDA

Área de Volumen

Número: 3662 MV

Página 2 de 4

1. DESCRIPCIÓN DEL INSTRUMENTO

OBJETO DE PRUEBA : PIPETA A PISTÓN
 TIPO : MONOCANAL DE VOLUMEN VARIABLE
 CÓDIGO : 02L05300200-45
 CLASE : A
 RESOLUCIÓN : 1 µl
 SITIO DE LA CALIBRACIÓN : LABORATORIO DETECTO SEDE SABANETA

2. MÉTODO DE CALIBRACIÓN

Para la medición del volumen del instrumento se utilizó el método gravimétrico.

El método gravimétrico consiste en determinar la masa del líquido que contiene el instrumento y dividirla por su densidad. EL agua utilizada para la calibración es des-ionizada grado 3 según la norma ISO-3696 con una temperatura de referencia a 20 °C.

To measure the volume of the instrument was used the gravimetric method.

The gravimetric method is to determine the mass of the liquid containing the instrument and divided by its density. Water used for calibration is des-ionized grade 3 according to ISO-3696 with a reference temperature of 20 °C.

3. CONDICIONES AMBIENTALES

PRESIÓN ATMOSFÉRICA	TEMPERATURA DEL AIRE	HUMEDAD RELATIVA DEL AIRE
Min 842,3 hPa - Max 842,8 hPa	Min 20,7 °C - Max 20,8 °C	Min 69,3 % hr - Max 71,5 % hr

Nota: Los datos reportados son las condiciones máximas y mínimas en el sitio y momento de la calibración.

Note: Data reported are high and low environmental conditions at the site and time of calibration.

4. INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN

La incertidumbre de medición reportada se ha determinado multiplicando la incertidumbre estándar combinada por el factor de cobertura $k = 2$ con el cual se logra un nivel de confianza de aproximadamente 95,45 %.

The measurement uncertainty reported is determined by multiplying the combined standard uncertainty by the coverage factor $k = 2$ which is achieved with a confidence level of approximately 95,45%.

La incertidumbre de medición expandida fue calculada de los componentes de incertidumbre de medida del patrón de referencia usado, del método de calibración, de la densidad del agua, de la densidad del aire, temperatura del agua, densidad de las pesas, coeficiente de expansión del material del instrumento.

La incertidumbre indicada no incluye una estimación de variaciones a largo plazo.

The expanded measurement uncertainty was calculated from the components of measurement uncertainty of the reference standard used, method of calibration, the density of water, air density, water temperature, density of the weights, expansion coefficient material of the instrument.

The uncertainty shown does not include an estimate of long-term variations.

ACREDITADO ISO/IEC 17025:2005
12-LAC-048

Número: 3662 MV
Página 3 de 4

LABORATORIO DE METROLOGÍA DETECTO DE COLOMBIA LTDA
Árca de Volumen

5. TRAZABILIDAD

El certificado de calibración documenta la trazabilidad a los patrones nacionales, que realizan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).

El usuario está obligado a calibrar el instrumento a intervalos apropiados.

The calibration certificate documents the traceability to national standards, which perform the measurement units gives according to the International System of Units (SI).

The user is required to calibrate the instrument at appropriate intervals.

5.1. IDENTIFICACIÓN DEL PATRÓN DE CALIBRACIÓN

PATRONES	CÓDIGO	CERTIFICADO	FECHA DE CALIBRACIÓN	CALIBRADO POR
BALANZA	BAL LAB 30	9584 M	2017-10-18	Detecto de Colombia
TERMÓMETRO	TER LAB 28	9150 C	2017-09-29	Metrologic Colombia

6. RESULTADOS DE CALIBRACIÓN

En la tabla de resultados se expresa el volumen calculado, el error de medición, la incertidumbre de medición obtenida durante la calibración.

La calibración se realiza tomando como referencia, la norma UNE-EN ISO 8655-6:2003.

7. TABLA DE RESULTADOS

Punto evaluado	Volumen Evaluado mL	Volumen Calculado mL	Error Sistemático mL	Error Sistemático μ L	Incertidumbre $\pm \mu$ L
1	0,1	0,09870	-0,00130	-1,30	0,23
2	0,5	0,49972	-0,00028	-0,28	0,22
3	1	1,00147	0,00147	1,47	0,28

Punto evaluado	Temperatura del Agua (°C)	Densidad del agua (g/cm ³)	Error Aleatorio μ L
1	19,8	0,99825	0,28
2	19,8	0,99825	0,25
3	19,8	0,99825	0,34

ACREDITADO ISO/IEC 17025:2005

12-LAC-048

LABORATORIO DE METROLOGÍA DETECTO DE COLOMBIA LTDA
Área de Volumen

Número: 3662 MV

Página 4 de 4

8. OBSERVACIONES

1. La estampilla de calibración fue adherida al instrumento.
2. Los certificados de calibración sin firmar no tienen validez.
3. Los resultados contenidos en el presente certificado se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones.
4. Las puntas utilizadas para la calibración son genéricas marca brand, suministradas por el Laboratorio Detecto.

FECHA DE EXPEDICIÓN:
Date of Issue

2017 -12 -20

FIN DEL CERTIFICADO

Certificado CCLEC-ASIU-3013: Pipeta Piccus (02L05300200-55) (Sartorius)

	CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN DE MICROPIPETAS COORDINACIÓN PROCESO GESTIÓN DE MANTENIMIENTO GESTIÓN DE SERVICIOS ADMINISTRATIVOS LABORATORIO DE EQUIPOS CIENTÍFICOS - ADMINISTRACIÓN SIU		
	ISO/IEC 17025:2005 12-LAC-010		

CERTIFICADO No. CÓDIGO INTERNO DEL CLIENTE

I. IDENTIFICACIÓN DE LA MICROPIPETETA

MARCA MODELO
 No. DE SERIE RANGO DE MEDICIÓN (µl)
 No. CANALES RESOLUCIÓN (µl)

II. DATOS DEL USUARIO/CLIENTE

USUARIO/CLIENTE
 DIRECCIÓN
 CIUDAD
 FECHA DE RECEPCIÓN
 FECHA DE CALIBRACIÓN

III. MÉTODO DE CALIBRACIÓN

El equipo fue calibrado por el método gravimétrico, el cual consiste en determinar la masa del agua grado III a partir de la diferencia de la masa del recipiente vacío y la masa del recipiente con agua; el control de la temperatura del agua, de la temperatura ambiente, la presión atmosférica y la humedad relativa, para realizar la evaluación del volumen a la temperatura de referencia. La densidad del agua grado III se conoce en función de la temperatura de la prueba. Esta calibración está basada en las normas ISO 8655-6:2002 e ISO 8655-6:2002, Corrigendum 1:2008 y se encuentra establecida en el Procedimiento de Calibración de Equipos de Medición (P-GA-03)

IV. CONDICIONES AMBIENTALES

Los valores reportados son el promedio de las condiciones ambientales medidas al inicio y al final de la calibración.

Temperatura (°C) Humedad relativa (%) Presión atmosférica (hPa)

V. RESULTADOS DE CALIBRACIÓN

CANAL No.:

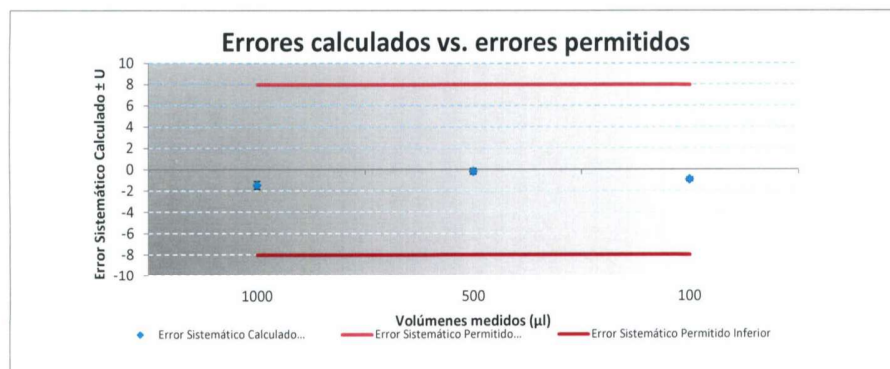
Los resultados contenidos en la siguiente tabla son valores promedios obtenidos de diez (10) mediciones:

	Volumen seleccionado (µl)	Volumen calculado (µl)	Error Sistemático Calculado (µl)	Error Aleatorio Calculado (µl)	Error Sistemático Permitido (µl)	Error Aleatorio Permitido (µl)	Incertidumbre de la medición expandida (µl)
Máximo	1000	998,53	-1,47	0,18	8,0	3,0	0,36
Medio	500	499,83	-0,17	0,29	8,0	3,0	0,28
Mínimo	100	99,07	-0,93	0,19	8,0	3,0	0,19

Resultado volumen máximo: 998,53 µl ± 0,36 µl
 Resultado volumen medio: 499,83 µl ± 0,28 µl
 Resultado volumen mínimo: 99,07 µl ± 0,19 µl

 SIU Ciencia con Alma	CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN DE MICROPIPETAS COORDINACIÓN PROCESO GESTIÓN DE MANTENIMIENTO GESTIÓN DE SERVICIOS ADMINISTRATIVOS LABORATORIO DE EQUIPOS CIENTÍFICOS - ADMINISTRACIÓN SIU		 ACREDITADO ONAC ORGANISMO NACIONAL DE Acreditación de COLOMBIA ISO/IEC 17025:2005 12-LAC-010
	CERTIFICADO No. CCLEC-ASIU-3013	CÓDIGO INTERNO DEL CLIENTE 02L05300200-55	

CERTIFICADO No. CCLEC-ASIU-3013 CÓDIGO INTERNO DEL CLIENTE 02L05300200-55



La incertidumbre expandida de la medición se establece como la incertidumbre normalizada de la medición multiplicada por el factor de cobertura $k=2$, tal que la probabilidad de cobertura corresponde aproximadamente al 95%.

VI. INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN

La estimación de la incertidumbre se encuentra basada en el ISO/TR 20461:2000 e ISO/TR 20461:2000, Corrigendum 1:2008 y el Procedimiento de Estimación de la Incertidumbre de la Medición en Calibración de Equipos (P-GA-07); considerando las fuentes de incertidumbre debidas a efectos aleatorios (repetibilidad de la prueba) y sistemáticos (instrumento de pesaje, densidad del aire, temperatura del agua y el equipo a calibrar).

VII. TRAZABILIDAD DE LAS MEDICIONES

Equipo	Serie	No. Certificado	Calibrado por	Fecha de calibración
Semimicrobalanza CPA225D (d1)	28204870	5765M	Detecto	12/03/2015
Termómetro digital 01 UT325 T1	1080740994	6070C	Metrologic	05/12/2015
Termómetro digital 01 UT325 T2	1080740994	5953C	Metrologic	09/11/2015
Barómetro digital 90080-07	150086623	1081-6528743	Control Company	05/02/2015
Termohigrómetro RH520A	CH20398	2421	Metrologic	19/02/2015
Cronómetro digital 01	140071034	5046-5677324	Control Company	31/01/2014

El Laboratorio de Equipos Científicos de la SIU garantiza la trazabilidad de sus patrones utilizados en estas mediciones a patrones nacionales o internacionales.

 SIU Ciencia con Alma <small>UNIVERSIDAD DE ANTIQUIA</small>	CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN DE MICROPIPETAS COORDINACIÓN PROCESO GESTIÓN DE MANTENIMIENTO GESTIÓN DE SERVICIOS ADMINISTRATIVOS LABORATORIO DE EQUIPOS CIENTÍFICOS - ADMINISTRACIÓN SIU	 <small>PROGRAMA NACIONAL DE ACREDITACIÓN DE COLOMBIA</small> ISO/IEC 17025:2005 12-LAC-010	
CERTIFICADO No.	CCLEC-ASIU-3013	CÓDIGO INTERNO DEL CLIENTE	02L05300200-55

Observaciones

Los certificados de calibración sin firmar no tienen validez.

Al instrumento no se le realizó ajuste.

Para la calibración del equipo se emplearon puntas sin filtro.

Se debe tener en cuenta que los resultados de las mediciones que se realicen con esta micropipeta se pueden ver afectados por el error sistemático y la incertidumbre de la medición expandida.

Los resultados presentados en el presente certificado se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones. El Laboratorio de Equipos Científicos de la SIU no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los equipos calibrados.

Los errores máximos permitidos declarados en el presente certificado fueron tomados de la Norma ISO 8655-2:2002 e ISO 8655-2:2002, Corrigendum 1:2008 capítulo 7 "Requisitos Metroológicos de Rendimiento", tabla 1 "Máximos errores permisibles para micropipetas monocanal tipo A y D1". Los máximos errores permitidos para micropipetas multicanal serán el doble de los especificados en la tabla 1 para micropipetas monocanal.

La calibración del equipo se realizó en la sede del Laboratorio de Equipos Científicos.

El usuario es responsable de determinar la aptitud de uso del equipo de acuerdo con la tolerancia especificada en su proceso así como de repetir la calibración del equipo a intervalos apropiados.

Este certificado no podrá ser reproducido parcialmente sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Vía correo electrónico recibirá el documento "Buenas prácticas de pipeteo" con el fin de garantizar un uso adecuado del equipo y disminuir los errores en los volúmenes dispensados.

En caso de requerir presentar al laboratorio una petición, queja, reclamo, sugerencia, denuncia o felicitación - PQRSDF, puede hacerlo en línea a través del link: <http://siuweb.udea.edu.co:8080/pqrs/>.

LUIS FELIPE GONZALEZ BOTERO

Realizó el control gravimétrico:

Luis Felipe González Botero

Auxiliar de Laboratorio de Metrología

JUAN FELIPE GALLEGU SIERRA

Aprobado por:

Juan Felipe Gallego Sierra

Ingeniero de Equipos Científicos

FIN DEL CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN

Certificado 9989 M: Balanza Analítica (Toledo)

Certificado de Calibración	
<i>Certificate of Calibration</i>	
 LABORATORIO DE METROLOGÍA DETECTO Laboratorio de Metrología	 ACREDITADO ONAC ORGANISMO NACIONAL DE AUTENTICACIÓN DE COLOMBIA ISO/IEC 17025:2005 12-LAC-048
Número: 9989 M <i>Number</i>	
LABORATORIO DE METROLOGÍA DETECTO DE COLOMBIA LTDA Detecto de Colombia Ltda. Metrology Lab. ÁREA DE MASA Mass Area	
INSTRUMENTO <i>Instrument</i>	BALANZA DIGITAL
FABRICANTE <i>Manufacturer</i>	METTLER TOLEDO
MODELO <i>Model</i>	PB3001-L
NÚMERO DE SERIE <i>Serial Number</i>	1128411288
RANGO DE CALIBRACIÓN <i>Calibration Range</i>	5 g a 1500 g
SOLICITANTE <i>Customer</i>	COLANTA
DIRECCIÓN DEL SOLICITANTE <i>Customer address</i>	AVENIDA 49 # 43-282 SAN PEDRO
FECHA RECEPCIÓN INSTRUMENTO <i>Instrument reception date</i>	2018 -02 -23
FECHA DE CALIBRACIÓN <i>Calibration date</i>	2018 -02 -23
NÚMERO DE PÁGINAS DEL CERTIFICADO INCLUYENDO ANEXOS <i>Number of pages of this certificate and documents attached</i>	Seis (6)
FIRMA(S) AUTORIZADA(S) <i>Authorized signature (s)</i>	
 Jessica Alexandra Yelez Calibrado por - Calibrated by:	 Milton Jair Cifuentes Revisado por - Checked by:
<p>Este certificado expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. No podrá ser reproducido total o parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del laboratorio que lo emite.</p> <p><i>This certificate is an accurate report of the performed measurements. This certificate may not be totally or partially reproduced, except with the written permission of the issuing laboratory.</i></p> <p>Los resultados contenidos en el presente certificado se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones. El laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados.</p> <p><i>The results of this certificate refer to the time and conditions when the measurements were made. The issuing laboratory assumes no responsibility for damages resulting from improper use of the calibrated instruments.</i></p> <p>Bogotá D.C. Calle 91 No. 49 A-24 B/. La Castellana PBX: 634 8182 Fax: 634 8173 E-mail: bogota@detectedecolombia.com Cali Calle SB4 No. 38-75 B/. San Fernando - PBX: 558 6060 Fax: 558 6161 E-mail: cali@detectedecolombia.com Medellín Calle 60 Sur No. 44-51 Sabaneta - Antioquia PBX: 444 1490 E-mail: medellin@detectedecolombia.com</p> <p style="text-align: center;">www.detectedecolombia.com</p>	

ACREDITADO ISO/IEC 17025:2005
12-LAC-048

Número: 9989 M
Pag. 2 de 6

LABORATORIO DE METROLOGÍA DETECTO DE COLOMBIA LTDA

SITIO DE CALIBRACIÓN:	LABORATORIO MICROBIOLOGÍA
CÓDIGO:	0001974
CARGA MÁXIMA:	1500 g
CARGA MÍNIMA:	5 g
RESOLUCIÓN:	0,1 g
DESVIACIÓN ESTÁNDAR:	0,1 g
DESVIACIÓN LINEAL:	N.I.
TEMPERATURA DEL AIRE:	23,1 °C
HUMEDAD RELATIVA DEL AIRE:	55,5 % hr
PRESIÓN ATMOSFÉRICA:	761,4 hPa

1. PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN

Para la calibración se empleó el método de comparación directa con los patrones y se sometió el instrumento a los ensayos de calibración de acuerdo a lo señalado en el numeral 5, GUÍA SIM MWG7/ cg-01/v.00:2009.

Las pruebas realizadas durante la calibración son las siguientes: Repetibilidad (5.1), Error de indicación (5.2), Excentricidad de carga (5.3).

For calibration we used the method of direct comparison with the patterns and subjected to the tests the instrument calibration procedure mentioned in paragraph 5, GUÍA SIM MWG7/ cg-01/v.00:2009.

Tests conducted during calibration are: Repeatability (5.1), Error indication (5.2), Eccentricity of load (5.3).

2. TRAZABILIDAD

El certificado de calibración documenta la trazabilidad a los patrones nacionales, que realizan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).

El usuario está obligado a calibrar el instrumento a intervalos apropiados.

This calibration certificate documents the traceability to national standards, which realize the units of measurement according to the International System of Units (SI).

The user is obliged to have the object calibrated at appropriate intervals.

www.dstectodecolumbia.com

ACREDITADO ISO/IEC 17025:2005
12-LAC-048

Número: 9989 M
Pag. 3 de 6

LABORATORIO DE METROLOGÍA DETECTO DE COLOMBIA LTDA

2.1 IDENTIFICACIÓN DEL PATRÓN DE CALIBRACIÓN

Para la operación de calibración se utilizaron pesas patrón.
For operation of calibration standard weights were used.

PESAS PATRÓN CLASE: F1

CERTIFICADO N°	FECHA DE CALIBRACIÓN	CALIBRADO POR
33561 C	2017-03-28	Laboratorio Detecto de Colombia Ltda.

3. RESULTADOS DE LA CALIBRACIÓN

Excentricidad : Se evalúa el parámetro de desempeño del instrumento

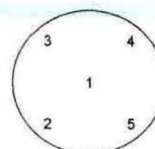
Repetibilidad : Se evalúa el parámetro de desempeño del instrumento

Error de indicación : Se evalúa el parámetro de trazabilidad del instrumento

3.1 EXCENTRICIDAD DE CARGA / LOAD ECCENTRICITY

Carga: 500 g

Punto	Indicación g	Diferencia g
1	500,0	0,0
2	500,0	0,0
3	500,0	0,0
4	500,0	0,0
5	500,0	0,0
Dif _{dec}	0,0	g



La prueba se realizó con una carga de 500 g y se encontró que el instrumento no presenta desviaciones respecto a la indicación 1.

ACREDITADO ISO/IEC 17025:2005
12-LAC-048

Número: 9989 M
Pag. 4 de 6

LABORATORIO DE METROLOGÍA DETECTO DE COLOMBIA LTDA

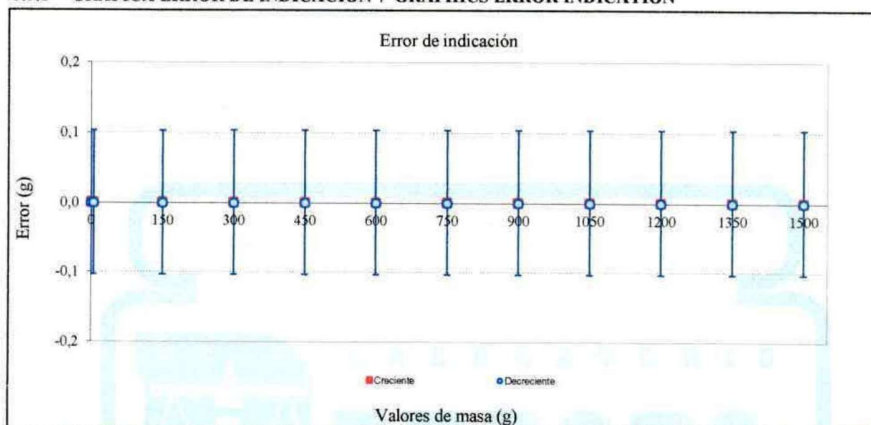
3.2 REPETIBILIDAD / REPEATABILITY

Carga	800 g	1200 g	1500 g
Repetición	Indicación g	Indicación g	Indicación g
1	800,0	1200,0	1500,0
2	800,0	1200,0	1500,0
3	800,0	1200,0	1500,0
4	800,0	1200,0	1500,0
5	800,0	1200,0	1500,0
6	800,0	1200,0	1500,0
7	800,0	1200,0	1500,0
8	800,0	1200,0	1500,0
9	800,0	1200,0	1500,0
10	800,0	1200,0	1500,0
Desv est	0,00	0,00	0,00

La desviación estándar corresponde a la repetibilidad del instrumento y el ensayo se realizó con cargas de 800 g, 1200 g y 1500 g.

3.3 ERROR DE INDICACIÓN / ERROR INDICATION

Carga g	CRECIENTE		DECRECIENTE		Incertidumbre ± g
	Indicación g	Error g	Indicación g	Error g	
0	0,0	0,00	0,0	0,00	0,10
5	5,0	0,00	5,0	0,00	0,10
150	150,0	0,00	150,0	0,00	0,10
300	300,0	0,00	300,0	0,00	0,10
450	450,0	0,00	450,0	0,00	0,10
600	600,0	0,00	600,0	0,00	0,10
750	750,0	0,00	750,0	0,00	0,10
900	900,0	0,00	900,0	0,00	0,10
1050	1050,0	0,00	1050,0	0,00	0,10
1200	1200,0	0,00	1200,0	0,00	0,10
1350	1350,0	0,00	1350,0	0,00	0,10
1500	1500,0	0,00	1500,0	0,00	0,10

LABORATORIO DE METROLOGÍA DETECTO DE COLOMBIA LTDA**3.3.1 GRÁFICA ERROR DE INDICACIÓN / GRAPHICS ERROR INDICATION**

El instrumento no presentó desviaciones en la prueba de errores de indicación.

4. INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN / MEASUREMENT UNCERTAINTY

La incertidumbre que se reporta es una función del valor a pesar con un factor de cobertura de $k = 2$, con el cual se logra un nivel de confianza de aproximadamente 95,45 %.

La incertidumbre fue evaluada tomando como referencia el numeral 7.1 - 7.3 de la GUÍA SIM MWG7/ cg-01/v.00:2009.

The uncertainty reported is a function of value despite a coverage factor $k = 2$, which is achieved with a confidence level of approximately 95,45 %.

Uncertainty was assessed by reference numeral 7.1 - 7.3 of the SIM GUIDE MWG7/ cg-01/v.00: 2009.

La incertidumbre de medición fue calculada teniendo en cuenta factores como la desviación estándar, excentricidad de carga, resolución del instrumento, incertidumbre de medida del patrón de referencia usado, corrección por empuje del aire, corrección por deriva del patrón.

La incertidumbre indicada no incluye una estimación de variaciones a largo plazo.

ACREDITADO ISO/IEC 17025:2005
12-LAC-048

Número: 9989 M
Pag. 6 de 6

LABORATORIO DE METROLOGÍA DETECTO DE COLOMBIA LTDA

The measurement uncertainty was calculated taking into account factors such as standard deviation, eccentricity of load, scale division of the instrument, measurement uncertainty of the reference standard used, air buoyancy correction, correction for drift of the pattern.

The uncertainty shown does not include an estimate of long-term variations.

$$U_{(Exp)} = U_0 + b_1 R$$
$$U_{(Exp)} \quad 0,10 \quad + \quad 1,1E-08 \quad R$$

Incertidumbre expandida en gramos.

R - Valor del objeto a pesar en gramos.

5. OBSERVACIONES / COMMENTS

1. La estampilla de calibración fue adherida al instrumento de medición.
2. Al instrumento no se le realizó ajuste.

FECHA DE EXPEDICIÓN

2018 -02 -26

Date of Issue

FIN DEL CERTIFICADO

Certificado: 3807-170816 POI: Autoclave horizontal (Centricol)



Pág. 1 de 21

Nro. Ensayo: 3807-170816 POI

CALIFICACION
Esterilizadores con Calor Húmedo

Protocolo de operación: Distribución de calor a 121°C

1. Realizo: Zoser S.A.S Tel 235-21-05, Cra. 59 # 23-25 Medellín – Ant.
2. Solicito: Empresa: Colanta San Pedro
Ubicación: Planta lácteos – Microbiología
Responsable: William E. Jaramillo Londoño
3. Equipo: Autoclave.
Marca: Centricol
Modelo: N/A
Nro. Serie: N/A
Código interno: 77021290014793
4. Fechas: Calificación: Agosto 17 de 2016
Recalificación: Agosto 17 de 2017

5. Aclaraciones:

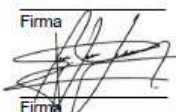
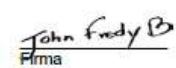
Zoser garantiza que mantiene la trazabilidad de los patrones usados en la validación, la cual está certificada por MADGETECH (NIST traceable) en los certificados adjuntos en el anexo 1.

Los procedimientos, conceptos y definiciones están documentados en:

- (a) "Process Validation: Terminal Sterilization Processes for Pharmaceutical Products", Guide – 0074. Health Products and Food Branch Inspectorate (HPFBI), Health Canada. nov 2006.
- (b) "Guidance Notes on Validation of Terminal Moist Heat Sterilization", Guide MQA-011-004. Health Sciences Authority (HAS). Sep 2004.

Que son adaptaciones actualizadas de la PDA 10 y la EN 285 y la ISO 17025.

El contenido de este informe no podrá ser reproducido parcial ni totalmente sin autorización por escrito del solicitante y Zoser.

<p>Aceptación del solicitante:</p> <p>Nombre _____</p>	<p>Firma _____</p>	<p>Fecha _____</p>
<p>Prueba realizada por</p> <p>Ing. John J. Jiménez</p>	<p>Firma </p>	<p>17/08/2016</p> <p>Fecha</p>
<p>Resultado revisado por:</p> <p>Ing. John F. Bustamante</p>	<p>Firma </p>	<p>17/08/2016</p> <p>Fecha</p>

Protocolo: P-016-F01

Versión: 01F

**PROTOCOLO CALIFICACION OPERACIÓN AUTOCLAVE:
DISTRIBUCIÓN DE CALOR**

1. PROPÓSITO

Conducir un estudio de distribución de calor, midiendo la temperatura en varios puntos, para verificar que el calor es uniforme en la cámara vacía. El estudio se ejecuta para garantizar que el equipo cumple con las especificaciones del fabricante, las definidas por el usuario del equipo, o los criterios fijados por organismos internacionales, con el fin de certificar que las condiciones de operación del equipo son consistentes.

El protocolo de operación consta de tres actividades, que se realizan simultáneamente:

- Análisis de distribución de calor.
- Calificación del control.
- Calificación de sensores.

Se realizan en tres ciclos sucesivos de esterilización, para garantizar la estabilidad de operación de la autoclave.

2. DESCRIPCIÓN DE LOS INSTRUMENTOS USADO PARA LA VALIDACIÓN.

Para la validación se utilizan *recolectores digitales de datos*, compuestos por una *sonda autónoma* para medir temperatura y un *programa de computador* para procesar los datos, tabulados y gráficamente.

La sonda la conforman un sensor de temperatura y un microprocesador con las siguientes especificaciones:

<i>Descripción:</i>	Recolector de Temperatura
<i>Marca:</i>	Madgetech
<i>Modelo:</i>	HiTemp140
<i>Unidades:</i>	°C
<i>Resolución:</i>	0,01 °C
<i>Memoria:</i>	32767
<i>Rango de lectura</i>	-40°C / + 150°C
<i>Tipo de Sensor</i>	100 Ohms Platinum RTD
<i>Cantidad de recolectores utilizados</i>	6
<i>Puntos de referencia de cada recolector</i>	0°C / 48,8 °C / 148 °C
<i>Procesador</i>	Reloj de tiempo real con resolución de 2 segundos a 12 horas, Memoria no volátil
<i>Trazabilidad</i>	N.I.S.T.

Los certificados de calibración están en el anexo1.

5. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS

5.1 CONDICIONES DE LA VALIDACIÓN

Presión atmosférica 85 kPa (12.34 PSI)
 Temperaturas: inicial 24 °C final 24 °C
 Humedad relativa: inicial 49 % final 49 %

5.2 ESTUDIO DE DISTRIBUCIÓN

Temperatura de esterilización programada: 121 °C
 Tiempo de esterilización: 15 min
 Presión de operación: 16 a 20 PSig

Tabla 1. Ciclos realizados y recolectores utilizados.

Ciclo	Fecha	Hora		Recolectores (+)					
		Inicial	Final	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 4	Posición 5	Posición 6
1	17/08/2016	9:54:30 a. m.	10:09:30 a. m.	P79090 (++)	P50601	P79091	P94695	P94696	P94701
2	17/08/2016	10:34:00 a. m.	10:49:00 a. m.	P79090 (++)	P50601	P79091	P94695	P94696	P94701
3	17/08/2016	11:19:00 a. m.	11:34:00 a. m.	P79090 (++)	P50601	P79091	P94695	P94696	P94701

(*) Los certificados de calibración están en el anexo 1.

(++) Recolector próximo al sensor de temperatura de la autoclave.

UBICACIÓN DE LOS SENSORES

La ubicación de los recolectores usados en la validación se presenta en la fig 1.

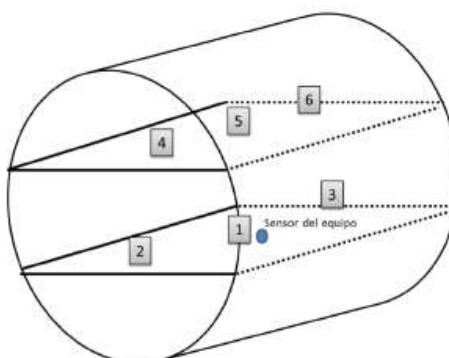


Figura 1. Ubicación de los sensores patrón.

5.2.1 Calificación de la distribución de calor

Los datos capturados con los recolectores utilizados en los tres ciclos están en el registro digital adjunto al informe. Las gráficas de los tres ciclos están en el anexo 3.

Las temperaturas media (T_{med}), mínima (T_{min}) y máxima (T_{max}) promediada de cada recolector en cada ciclo están consignadas en la tabla 2

Tabla 2. Distribución de temperaturas en la cámara vacía.

CICLO	Tmed	Tmin	Tmax	dif min	dif max	Cumple
1	120,54	120,17	120,96	0,37	0,42	Si
2	120,74	120,39	121,16	0,35	0,42	Si
3	120,82	120,38	121,25	0,44	0,43	Si

(-) $T_{med} - T_{min}$

(+) $T_{max} - T_{med}$

Las diferencias de temperatura están dentro del rango de valores permitidos; por lo tanto la autoclave evaluada cumple con el criterio de distribución de calor.

5.2.2 Calificación del controlador

Tabla 3. Calibración dinámica del controlador de temperatura.

CICLO	Tcontrol	Tmed	Tmin	Tmax	dif min	dif max	Cumple
1	121°C	120,45	120,17	120,69	0,83	-0,31	Si
2	121°C	120,67	120,40	120,89	0,60	-0,11	Si
3	121°C	120,74	120,38	120,94	0,62	-0,06	Si

(-) $T_{control} - T_{min}$

(+) $T_{max} - T_{control}$

La diferencia de temperatura entre el valor programado en el control y la indicada por los recolectores son aceptables. (Se toma como referencia de control el recolector 1)

Tabla 4. Calibración dinámica del temporizador.

Ciclo	Tiempo (minutos)		Desviación (%)	Cumple (si/no)
	Programa ^(#)	medido ^(*)		
1	15	15	0	Si
2	15	15	0	Si
3	15	15	0	Si

(*) Tiempo del recolector próximo al sensor

(#) Obtenida del indicador o registro del equipo

La desviación entre el tiempo programado en el control y el indicado por los recolectores (patrón) son aceptables.

Los valores de temperatura y tiempo media están dentro del rango de valores permitidos; por lo tanto la autoclave evaluada cumple con el criterio de calificación del control.

6. CONCLUSIONES

Las diferencias de temperatura en distintos puntos de la cámara vacía, obtenidas durante el estudio de distribución de calor cumplen o están dentro del rango permitido.

Asimismo, el control y los sensores dieron lecturas que están dentro de los rangos permitidos, en los tres ciclos sucesivos de prueba.

Por estas dos razones, la autoclave evaluada cumple el protocolo de validación de operación.

7. DISCREPANCIAS

Objeción: N.A
Solución: N. A.

Responsable: N.A.
Firma: N.A.

8. REFERENCIAS

1. "Process Validation: Terminal Sterilization Processes for Pharmaceutical Products", Guide – 0074. Health Products and Food Branch Inspectorate (HPFBI), Health Canada. nov 2006.
2. "Validation of Steam Sterilization Cycles", Technical Monograph No. 1, Parenteral Drug Association, Inc. (PDA), Philadelphia, PA
3. "Guidance for Industry for the Submission Documentation for Sterilization Process Validation in Applications for Human and Veterinary Drug Products". US Food and Drug Administration (FDA). nov 1994.
4. "Sterilization - Steam Sterilizers - Large Sterilizers", DIN EN 285. European Norme. 2006
5. "Sterilization of Medical Devices - Validation and Routine Control of Sterilization by Moist Heat", EN554. European Norme
6. "Guidance Notes on Validation of Terminal Moist Heat Sterilisation", Guide MQA-011-004. Health Sciences Authority (HAS). Sep 2004.

ANEXOS**ANEXO 1: CERTIFICADOS DE CALIBRACIÓN DE LOS RECOLECTORES DE DATOS**

Nro serie	Marca	Modelo	Descripción	Calibración DD/MM/AA	Revisión DD/MM/AA
P79090	MadgeTech	HiTemp140	Recolector de datos de temperatura	21-09-2015	21-09-2016
P50601	MadgeTech	HiTemp140	Recolector de datos de temperatura	07-09-2015	07-09-2016
P79091	MadgeTech	HiTemp140	Recolector de datos de temperatura	21-09-2015	21-09-2016
P94695	MadgeTech	HiTemp140	Recolector de datos de temperatura	09-05-2016	09-05-2017
P94698	MadgeTech	HiTemp140	Recolector de datos de temperatura	09-05-2016	09-05-2017
P94701	MadgeTech	HiTemp140	Recolector de datos de temperatura	09-05-2016	09-05-2017


Certificado 10644774: Dilumat Expert (AES)

1

SERVICE REPORT: 10644774

ORDEN DE COMPRA:

TIPO: 008 PREVENTIVE MAINTENANCE



Pagina 1 of 1

Sistema:	SYS-DILUMAT EVO	Direccion
Numero:	731318	COOPERATIVA COLANTA LTDA
Equipo:	<i>Dilumat</i>	SUMINISTROS
Numero:		AV 49 43 282
Número de Serie:	<i>10037867</i>	05664 SAN PEDRO
		CO COLOMBIA
Tipo de Acuerdo:	GARANTIA-DILUMAT	Vendido A: 1052307
N Contrato:	450156921	Enviado A: 2051129
F. Vencimiento:	31-DIC-2016	Contacto:
		Telefono:
Fecha de Envio:	07-SEP-2017	
F. Arribo/Hora:	12-SEP-2017	
F. Finalizacion/Hr:	12-SEP-2017	14:24:07

Causa reportada: MAINT PREV 2017 - 2018

Accion Tomada:

12.09.2017 19:22:56 UTC David BETANCUR (90016125)
 MANTENIMIENTO PREVENTIVO ANUAL
 SERIAL INSTRUMENTO 10037867

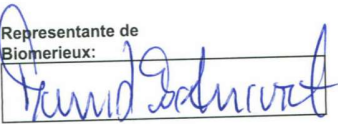
REVISIÓN EQUIPO, LIMPIEZA Y DESCONTAMINACIÓN GENERAL, VERIFICACIÓN CABEZAL BOMBAS PERISTALTICAS, BRAZO, DISPLAY, CABLEADO INTERNO-EXTERNO, CHEQUEO MAGUERAS, VERIFICACIÓN CALIBRACIONES, OK. EQUIPO EN FUNCIONAMIENTO, LISTA DE CHEQUEO ANEXA.

Parte	Referencia	Nombre de Producto	Número de lote
Cantidad			

Tiempo y Gastos	Cantidad	Nombre de Producto	Tipo
Fecha			
12.09.2017	1,0 ZON	Viaje un recorrido	TRAVEL
12.09.2017	2,0 H	Mano de Obra	LABOUR

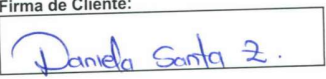
El sistema esta operando de acuerdo a especificaciones de fabricacion

Representante de Biomerieux:



Nombre de Cliente:

Firma de Cliente:



BIOMERIEUX COLOMBIA S.A.S.

Carrera 7 No. 127-48 Oficina 806 - Bogotá, D.C. - PBX: (571) 593 2530 -647 6011 - Fax: (571) 647 5542

ANEXO 3. Trazabilidad de la matriz empleada para la validación

COOPERATIVA COLANTA
División Técnica
Departamento de Control Calidad

CERTIFICADO DE CALIDAD

YOGUR SEMIDESCREMADO, CON DULCE, CON FRESA

Fecha de informe: miércoles, 7 de noviembre de 2018
Laboratorio y/o planta: Lácteos San Pedro
Destino: Ventas
Presentación: 200g
No. Lote: 3537020501
Fecha de análisis: miércoles, 20 de diciembre de 2017
Fecha empaque: martes, 19 de diciembre de 2017
Fecha vencimiento: domingo, 28 de enero de 2018

ESPECIFICACIONES FÍSICOQUÍMICAS		
PARÁMETRO	REQUISITO	RESULTADO
Temperatura de conservación (°C)	2 - 6	5,3
Acidez como Ácido Láctico (% m/m)	0,60 - 1,5	0,701
Materia grasa (% m/m)	1,50 - 2,40	1,80

ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS		
PARÁMETRO	REQUISITO	RESULTADO
Recuento Coliformes totales (ufu/g)	Máximo 100	<10
Recuento de E. coli (ufu/g)	<100	<10
Recuento de mohos y levaduras (ufu/g)	Máximo 500	<10

OBSERVACIONES

* N.A.: No aplica para este producto
Sensorial: Cumple especificaciones de aspecto, color, olor y sabor.

REVISADO


Supervisor Control Calidad

Carrera 40 # 40 - 86 Santo Miraflores
San Pedro de los Milagros - Antioquia
www.colanta.com.co

COOPERATIVA COLANTA
División Técnica
Departamento de Control Calidad

CERTIFICADO DE CALIDAD

YOGUR SEMIDESCREMADO, CON DULCE, CON MORA

Fecha de informe: miércoles, 7 de noviembre de 2018
Laboratorio y/o planta: Lácteos San Pedro
Destino: Ventas
Presentación: 200g
No. Lote: 2857029002
Fecha de análisis: viernes, 13 de octubre de 2017
Fecha empaque: viernes, 13 de octubre de 2017
Fecha vencimiento: martes, 21 de noviembre de 2017


ESPECIFICACIONES FÍSICOQUÍMICAS		
PARÁMETRO	REQUISITO	RESULTADO
Temperatura de conservación (°C)	2 - 6	5,3
Acidez como Ácido Láctico (% m/m)	0,60 - 1,5	0,721
Materia grasa (% m/m)	1,50 - 2,40	1,80

ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS		
PARÁMETRO	REQUISITO	RESULTADO
Recuento Coliformes totales (ufu/g)	Máximo 100	<10
Recuento de E. coli (ufu/g)	<100	<10
Recuento de mohos y levaduras (ufu/g)	Máximo 500	<10

OBSERVACIONES

* N.A.: No aplica para este producto
Sensorial: Cumple especificaciones de aspecto, color, olor y sabor.

REVISADO


Supervisor Control Calidad

Carrera 40 # 40 - 86 Santo Miraflores
San Pedro de los Milagros - Antioquia
www.colanta.com.co

COOPERATIVA COLANTA
División Técnica
Departamento de Control Calidad

CERTIFICADO DE CALIDAD

YOGUR SEMIDESCREMADO, CON DULCE, CON MELOCOTÓN

Fecha de informe: miércoles, 7 de noviembre de 2018
Laboratorio y/o planta: Lácteos San Pedro
Destino: Ventas
Presentación: 200g
No. Lote: 3137028901
Fecha de análisis: sábado, 11 de noviembre de 2017
Fecha empaque: viernes, 10 de noviembre de 2017
Fecha vencimiento: martes, 19 de diciembre de 2017

ESPECIFICACIONES FÍSICOQUÍMICAS		
PARÁMETRO	REQUISITO	RESULTADO
Temperatura de conservación (°C)	2 - 6	5,0
Acidez como Ácido Láctico (% m/m)	0,60 - 1,5	0,747
Materia grasa (% m/m)	1,50 - 2,40	1,80

ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS		
PARÁMETRO	REQUISITO	RESULTADO
Recuento Coliformes totales (ufu/g)	Máximo 100	<10
Recuento de E. coli (ufu/g)	<100	<10

OBSERVACIONES

* N.A.: No aplica para este producto
Sensorial: Cumple especificaciones de aspecto, color, olor y sabor.

REVISADO


Supervisor Control Calidad

Carrera 40 # 40 - 86 Santo Miraflores
San Pedro de los Milagros - Antioquia
www.colanta.com.co