



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN Y VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO  
CUALITATIVO Y UNO CUANTITATIVO PARA LA  
DETECCIÓN Y RECuento DE *Vibrio parahaemolyticus*  
EN PRODUCTOS HIDROBIOLÓGICOS**

**Edson Andrés Pincheira Vásquez**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal.

**PROFESOR GUÍA: PILAR OVIEDO HANNIG**  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE  
2016



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN Y VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO  
CUALITATIVO Y UNO CUANTITATIVO PARA LA  
DETECCIÓN Y RECuento DE *Vibrio parahaemolyticus*  
EN PRODUCTOS HIDROBIOLÓGICOS**

**Edson Andrés Pincheira Vásquez**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal.

NOTA FINAL: .....

FIRMA

PROFESOR GUÍA : DRA. PILAR OVIEDO H. ....

PROFESOR CONSEJERO : DRA. JAVIERA CORNEJO K. ....

PROFESOR CONSEJERO : DRA. CONSUELO BORIE P. ....

SANTIAGO, CHILE

2016

## **MEMORIA DE TÍTULO**

“IMPLEMENTACIÓN Y VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO CUALITATIVO Y UNO CUANTITATIVO PARA LA DETECCIÓN Y RECUENTO DE *Vibrio parahaemolyticus* EN PRODUCTOS HIDROBIOLÓGICOS”

"IMPLEMENTATION AND VERIFICATION OF A QUALITATIVE AND QUANTITATIVE METHOD FOR DETECTION AND COUNT OF *Vibrio parahaemolyticus* IN SEAFOOD PRODUCTS"

**Edson Andrés Pincheira Vásquez\***

\*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
Enfermedades Transmitidas por Alimentos .....	7
Agente Etiológico .....	8
Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos .....	9
Método Cualitativo Norma ISO 21872-1 .....	10
Método Cuantitativo Norma <i>V. parahaemolyticus</i> FDA-BAM .....	10
<b>OBJETIVOS</b> .....	11
OBJETIVO GENERAL .....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
1 Cepa bacteriana.....	12
2 Matriz alimentaria .....	12
3 Diseño experimental .....	13
3.1 Implementación metodologías .....	13
3.1.2 Metodología Cualitativa.....	13
3.1.3 Metodología Cuantitativa.....	14
4 Verificación.....	15
4.1 Metodología Cualitativa.....	15
4.2 Metodología Cuantitativa.....	16
5 Normas de bioseguridad .....	16
<b>RESULTADOS</b> .....	17
6 Metodología Cualitativa.....	17
6.1 Metodología Cualitativa en Matriz Salmón .....	17
6.2 Metodología Cualitativa en Matriz Chorito .....	17
7 Metodología Cuantitativa.....	18
7.1 Metodología Cuantitativa en Matriz Salmón .....	18
7.2 Metodología Cuantitativa en Matriz Chorito .....	20
<b>VERIFICACIÓN</b> .....	21
8 Método Cualitativo ambas Matrices .....	21
9 Método Cuantitativo Matriz Salmón.....	22
9.1 Repetibilidad .....	22
9.2 Reproducibilidad.....	23
9.3 Exactitud .....	24
9.4 Incertidumbre.....	25
10 Método Cuantitativo Matriz Chorito.....	25
10.1 Repetibilidad .....	25
10.2 Reproducibilidad.....	27
10.3 Exactitud .....	27
10.4 Incertidumbre.....	28
<b>DISCUSIÓN</b> .....	29

<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>31</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>32</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>35</b>
ANEXO 1 .....	35
ANEXO 2 .....	36
ANEXO 3 .....	37
ANEXO 4 .....	38
ANEXO 5 .....	39
ANEXO 6 .....	40
ANEXO 7 .....	41
ANEXO 8 .....	42
ANEXO 9 .....	43
ANEXO 10.....	44

## RESUMEN

La bacteria *Vibrio parahaemolyticus* corresponde a una de las principales ETA de la temporada de verano a lo largo de todo Chile, principalmente debido al consumo de productos del mar crudos o mal cocidos. Para su detección o recuento existen dos técnicas referenciales: Una cualitativa perteneciente a ISO (International Organization for Standardization), que expresa su resultado como presencia o ausencia de *V. parahaemolyticus* y otra cuantitativa perteneciente a FDA-BAM (Food & Drugs Administration's Bacteriological Analytical Manual) que expresa su resultado como NMP/g.

Ambos métodos fueron implementados y verificados en dos matrices hidrobiológicas, cada matriz fue compuesta por 10 muestras de salmón y 10 muestras de chorito. El trabajo se realizó en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

En el método cualitativo ISO 21782 se logró reconocer la presencia de la bacteria en el 100% de las muestras contaminadas, y a su vez todos los controles negativos arrojaron como resultado la ausencia de *V. parahaemolyticus* en ambas matrices. Para cumplir con la verificación del método cuantitativo FDA-BAM se debió realizar la contaminación de las muestras con tres niveles distintos de inóculo ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ). Se logró apreciar directa relación entre el nivel de inóculo contaminado y el resultado obtenido posteriormente en la Tabla NMP del mismo método. Los resultados de ambos métodos cumplieron con la verificación ISO 16140.

Los resultados pueden concluir que el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, se encuentra capacitado para la implementación de normas de referencia internacional, con el fin de cooperar y ser una herramienta válida para la detección y recuento de este patógeno en las matrices estudiadas.

Palabras claves: *V. parahaemolyticus*, implementación, verificación, ISO, FDA-BAM.

## ABSTRACT

The bacteria *Vibrio parahaemolyticus* corresponds to one of the main ETA of the summer season throughout Chile, mainly due to the consumption of raw or undercooked seafood. In order to detect and count that bacteria; there are two reference techniques: A qualitative, that belongs to ISO (International Organization for Standardization), which expresses its result in two terms; either as presence or absence of *V. parahaemolyticus*. Secondly, the quantitative technique, belonging to FDA-BAM (Food & Drug Administration's Bacteriological Analytical Manual), that expresses its result as NMP/g.

Both methods were implemented and verified on two seafood matrixes, each of them was composed of 10 salmon samples and 10 chorito samples as well. This process was put into effect at the Laboratory of Food Safety Department of Animal Preventive Medicine of the Faculty of Veterinary and Animal Sciences at the University of Chile.

In the qualitative method ISO 21782, the presence of the bacteria was recognized in 100% of contaminated samples, at the same time every negative control showed, as a result, the absence of *V. parahaemolyticus* in both matrixes. In order to fulfill the requirements of verification of FDA-BAM quantitative method, the contamination of samples with three different levels of inoculums ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ) had to be done. Thanks to this; it was possible to appreciate the direct relationship between the level of contaminated inoculums and the result obtained in the Table NMP of the same method. The results of both methods meet the requirements of the ISO 16140 verification.

The results obtained conclude that the Laboratory of Food Safety Department of Animal Preventive Medicine of the Faculty of Veterinary and Animal Sciences at the University of Chile is trained for the implementation of international reference standards methods in order to cooperate and be a valid tool for the detection and count of *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *V. parahaemolyticus*, implementation, verification, ISO, FDA-BAM.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son un problema transversal que afecta a la población no sólo en términos de salud; se puede observar su impacto también en el plano social, tecnológico, económico, y político. La OMS establece a las ETA como un problema que afecta gravemente a grupos vulnerables (lactantes, niños pequeños, ancianos y enfermos), pudiendo incluso provocarles la muerte tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo.

Las ETA, junto con el fomento del comercio, son las razones por las cuales Chile debe fortalecer y garantizar, la promoción y distribución de productos inocuos a mercados nacionales e internacionales, ya que la exportación de estos es cada vez más relevante para la economía nacional. Actualmente, el país ocupa el décimo lugar en producción acuícola en el mundo, es por ello que resulta primordial tener sistemas confiables para la detección de microorganismos y contaminantes.

Dentro de las ETA de origen hidrobiológico más importantes, se encuentra la vibriosis causada por *V. parahaemolyticus*, responsable de tres grandes brotes identificados en Chile, en los años 1998, 2003 y 2005, y que manifiesta un aumento de su incidencia a nivel mundial, en los últimos años.

En búsqueda de la estandarización en los laboratorios de inocuidad alimentaria, internacionalmente se utilizan las Normas referenciales de análisis microbiológicos, tal como lo hace el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) a través de sus programas de aseguramiento de la calidad en productos de exportación en sus laboratorios autorizados. Por este motivo, en la presente memoria de título se implementaron y verificaron dos métodos referenciales de análisis de *Vibrio parahaemolyticus* aplicados a productos hidrobiológicos. Las metodologías implementadas fueron las descritas en la norma de detección ISO 21872-1 y la norma de recuento FDA-BAM específica para la bacteria. Todo esto con el fin de responder a las nuevas demandas definidas por la autoridad y transformar al Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile en una nueva herramienta para el estudio de este patógeno.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Enfermedades Transmitidas por Alimentos

Una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) es el síndrome originado por la ingesta de alimentos y/o agua, que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afectan la salud del consumidor, a nivel individual o en grupos de población (FAO/OMS, 2004). Con el fin de controlar y minimizar el número de casos de ETA, se instauran diferentes medidas comunes a muchos países, que van desde la adecuación de reglamentaciones hasta incentivos económicos de distinta naturaleza para la industria alimentaria. Se realizan también campañas educativas y otras maneras de crear y aumentar el nivel de conciencia y conocimiento entre el público, en general, acerca de la importancia de la inocuidad alimentaria y de prácticas de manejo y consumo de alimentos que contribuyen a disminuir la incidencia de ETA (Kopper, 2009).

En el año 2005, en Chile, un estudio de evaluación de riesgo microbiológico basado en Codex- FAO/OMS, postula que la estimación del riesgo de enfermarse de vibriosis, bajo condiciones determinadas, es de un 20% en la región de Los Lagos (Lupin, *et al.*, 2008). Región que concentra un 77% de la producción total de moluscos bivalvos del país (FAO, 2005).

La infección alimentaria por *Vibrio parahaemolyticus* causa tres entidades clínicas reconocidas: gastroenteritis, septicemia e infección de heridas. El cuadro intestinal es el más frecuente, caracterizado por diarrea acuosa y cólicos abdominales que pueden acompañarse de náuseas, vómitos, fiebre y cefalea (Fica, 2007). Estas infecciones son causadas principalmente por la ingesta de moluscos bivalvos crudos o mal cocidos, y han producido tres grandes brotes en Chile (Antofagasta en el año 1998 con 293 casos, Puerto Montt, año 2003 con 1.500 casos y varias ciudades de Chile en el año 2005 con más de 10.000 casos). Durante el año 2007 los casos notificados hasta el 24 de abril fueron 3.651, causando serios problemas al sistema de salud y exportaciones (ISP, 2014).

En el año 2013 se aprecia un aumento en el porcentaje de brotes en comparación a los años 2011 y 2012. Del total de brotes notificados, el 64% se asoció a un tipo de alimento, siendo los más frecuentemente involucrados, los mariscos (75%). Actualmente se desarrolla un proceso de vigilancia, la cual es realizada durante el período estival, puesto que aumenta el

riesgo de enfermar debido al aumento de la temperatura del agua de mar, que se ha demostrado como uno de los factores que favorecen el crecimiento de la bacteria (MINSAL, 2014).

En el año 1989 se establece un convenio de entendimiento entre el Estado Chileno y el Food and Drugs Administration (FDA), para la exportación de moluscos bivalvos frescos a Estados Unidos, conocido como “Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos”, (PSMB-USA). En el caso de la Unión Europea, PSMB-UE, el programa cumple las normas definidas por la autoridad sanitaria Europea en su Reglamento CE N°853/2004 y CE N°854/2004, donde se detallan los requisitos específicos para la importación de moluscos bivalvos. Los organismos gubernamentales involucrados en este convenio son: El Ministerio de Salud y el Ministerio de Economía, Fomento y Turismo, siendo el Servicio Nacional de Pesca, el organismo regulador, encargado de dar cumplimiento a los requisitos establecidos por Estados Unidos y la Unión Europea en todo el proceso de extracción y exportación de moluscos bivalvos (FAO, 2007; FIP, 2008; SERNAPESCA, 2007a).

### **Agente Etiológico**

En el grupo de agentes patógenos que causan ETA se encuentra el *Vibrio parahaemolyticus*. El género *Vibrio* está compuesto por bacilos, móviles con un flagelo polar. Son tres especies las que se consideran altamente patógenas para el humano: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Igualmente *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. metschnikovii* y *V. hollisae* se reconocen como patógenos ocasionales. Todas estas especies representan una proporción significativa de las enfermedades provocadas por el consumo de mariscos crudos o mal cocidos (FDA, 2014).

Es un bacilo Gram negativo, levemente curvo, aerobio facultativo, halófilo, con reacción oxidasa positiva, fermentador de glucosa y ureasa variable. Requiere de medios selectivos para su desarrollo, con una concentración de NaCl desde 1%. En el ambiente forma parte de la flora normal de estuarios y costas del mundo. Es una bacteria emergente en Chile que ha producido brotes epidémicos en clara asociación con el consumo de mariscos, especialmente moluscos bivalvos (choritos, ostras, almejas, machas, cholgás) crudos o mal cocidos. Estos moluscos abundan en aguas templadas y con nutrientes; se alimentan de fitoplancton a través de branquias, las cuales por acción de cilios filtran grandes volúmenes

de agua, reteniendo las partículas alimenticias y concentrando las bacterias en sus glándulas digestivas (Heitmann, *et al.*, 2005; Fica, 2007). Las condiciones ambientales favorables para el desarrollo y crecimiento de la bacteria son una temperatura de 10°C-44°C (óptimo: 35°C-37°C), pH de 5-11 (óptimo: 7,5-8,6), condiciones atmosféricas: aeróbica o anaeróbica (óptimo: aeróbica), concentración de NaCl 3%-8% (Quiñónez, *et al.*, 2005).

### **Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos**

El *V. parahaemolyticus* pertenece al PSMB, el cual es un componente integral del programa de vigilancia de sanidad para los productos pesqueros, establecido por el Servicio Nacional de Pesca. El programa se basa en los requisitos establecidos en los Reglamentos Comunitarios y en el National Shellfish Sanitation Program del FDA. Tiene como objetivo garantizar la calidad sanitaria de los moluscos bivalvos de exportación, a través de la clasificación y monitoreo de las áreas de extracción, respecto a la ocurrencia de floraciones de algas nocivas (FAN) o marea roja y de microorganismos que afecten la salud humana. Dentro de la exportación destaca el recurso Chorito (*Mytilus chilensis*) con porcentajes por sobre un 80% del total de productos exportados, desde el año 2012. Los centros de cultivo de chorito se centran en la X región, conformados por 12 bancos naturales y 136 áreas de cultivo. Las etapas del PSMB se dividen en:

1. Clasificación del área de extracción: Inspección sanitaria/Evaluación de la línea de costa. Muestreos y análisis.

La evaluación de la línea de costa consiste en una evaluación en terreno de las fuentes de contaminación actuales y potenciales que afectan directa o indirectamente el área de crecimiento de moluscos bivalvos.

2. Monitoreo del área clasificada: Muestreos y análisis.

Se requiere extraer como mínimo 5 muestras por estación de muestreo. Los análisis incluirán determinaciones microbiológicas, fisicoquímicas, de toxicidad y cualquier otra, de acuerdo con la condición sanitaria de cada área en particular.

La frecuencia de monitoreo para *Vibrio parahaemolyticus* es quincenal en períodos de extracción (Rozas, 2010).

Con el objetivo de certificar y exportar productos hidrobiológicos inocuos se utilizan dos normas independientes entre sí, una cualitativa y otra cuantitativa para la detección y recuento de *V. parahaemolyticus* respectivamente. La metodología cualitativa es desarrollada por la norma ISO 21872 y la metodología cuantitativa por la Norma BAM.

#### **Método cualitativo Norma ISO 21872-1**

Una norma ISO es un documento de referencia que proporciona los requisitos, especificaciones, directrices o características que pueden ser utilizadas consistentemente para asegurar que los materiales, productos, procesos y servicios son adecuados para su propósito (ISO, 2014a).

La Norma 21872-1 es aplicable a la detección de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae*. Ambas especies causantes de enfermedad intestinal en humanos. Es recomendada para productos destinados al consumo humano y animal. También para muestras ambientales en áreas de producción y manipulación de alimentos. Los resultados se expresarán como presencia o ausencia de *Vibrio spp.* potencialmente enteropatógeno (ISO, 2007).

#### **Método cuantitativo Norma *V. parahaemolyticus* FDA-BAM**

La FDA es la agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación en alimentos, medicamentos, cosméticos, aparatos médicos, productos biológicos y derivados sanguíneos, tanto para personas como para animales. A través de las normas BAM, “Bacteriological Analytical Manual”, la FDA indica los procedimientos de referencia aceptados para el análisis microbiológico (FDA, 2014).

La norma BAM para *V. parahaemolyticus* es aplicable para la detección de la bacteria en productos hidrobiológicos y alimentos en general. Corresponde a un método cuantitativo, en el que los resultados se expresan como NMP/g.

Posteriormente, la verificación, se realizó según la norma ISO 16140, cuyo propósito es demostrar que un laboratorio es capaz de cumplir con las exigencias de ejecución del método en condiciones habituales de trabajo, es decir, sometido a variantes tales como los analistas, matrices, insumos, equipos, entre otras (Fornés, 2014).

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Implementar y verificar un método cualitativo y un método cuantitativo para la detección de *Vibrio parahaemolyticus* en productos hidrobiológicos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Implementar el método cualitativo ISO 21872 de detección de *Vibrio parahaemolyticus* en productos hidrobiológicos.
2. Implementar el método cuantitativo BAM de recuento de *Vibrio parahaemolyticus* en productos hidrobiológicos.
3. Verificar la ejecución de ambos métodos, de acuerdo a la norma ISO 16140.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de implementación y verificación de las metodologías analíticas se realizó en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos, perteneciente al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### **1 Cepa bacteriana**

Corresponde a una cepa nativa perteneciente al cepario del Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, la cual fue identificada por la técnica espectrometría de masas, MALDI-TOF, en el Instituto de Salud Pública de Chile.

### **2 Matriz alimentaria**

Para este estudio se utilizaron dos matrices alimentarias: Salmón (*Oncorhynchus kisutch*) y Chorito (*Mytilus chilensis*). Para el método cualitativo, cada matriz estuvo compuesta de 10 muestras, de 25 gramos cada una. En el método cuantitativo, la matriz salmón estuvo compuesta por la misma cantidad de muestras, correspondientes a un pool de 300 gramos cada una, con el fin de cumplir con la verificación del método. Y la matriz chorito por 10 muestras de 12 piezas cada una, tal como indica la norma.

Las muestras de salmón utilizadas corresponden a contramuestras congeladas proporcionadas por el Programa de Aseguramiento de la Calidad (PAC/SERNAPESCA) del laboratorio FARMAVET Universidad de Chile. El PAC consiste en un programa de certificación voluntario, basado en el concepto de análisis de peligros y control de puntos críticos (HACCP), al cual pueden optar todas las plantas pesqueras y barcos factoría. Este programa, sin embargo, es obligatorio para todas las empresas que están autorizadas para exportar a la UE y Estados Unidos. El rol de la industria en este Programa es implementar un sistema de prevención y control de peligros durante el proceso, con lo cual asegura la calidad e inocuidad de su producto final (SERNAPESCA, 2007b).

Las muestras de chorito fueron compradas en un supermercado de la Región Metropolitana y mantenidas en condiciones de congelación (-20°C).

### **3 Diseño experimental**

#### **3.1 Implementación metodológicas**

En ambos métodos, las muestras fueron inoculadas después del proceso de pesaje. El inóculo se preparó a partir de la cepa perteneciente al laboratorio. Desde un tubo criogénico, la cepa fue traspasada a 3 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubada a 35°C por 24 horas, luego se sembró por estría en un tubo con 9 mL de agar TSA (Trypticase Soy Agar) inclinado e incubado a 35°C por 24 horas. Posterior a esto, se traspasaron colonias, por medio de un asa, a un tubo con 9 mL de agua destilada y se ajustó su turbidez a un valor de absorbancia entre 0,08 y 0,13 a 625 nm de longitud de onda, medido con Spectroquant® Pharo 300-Merck reg, rango equivalente a la dilución  $10^8$  UFC/mL. Desde este nivel de turbidez, se procedió a realizar diluciones al décimo, con agua destilada esterilizada, hasta llegar a dilución  $10^1$ , con la cual se inocularon las muestras del método cualitativo y comprobó su concentración a través de recuento en placa. Para el método cuantitativo se utilizaron las diluciones  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ , las que se sembraron en agar recuento en placa, para comprobar su concentración y calcular la exactitud.

#### **3.1.2 Metodología Cualitativa**

Se realizó bajo la Norma ISO 21872-1: 2007. La cual es aplicable a todos los alimentos de consumo humano y animal, incluidos los productos hidrobiológicos, es decir, diversas especies marinas o de aguas interiores, frescas o procesadas.

Este método de ensayo permite determinar la presencia o ausencia de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* mediante la ejecución de las siguientes etapas:

- Pesaje e inoculación (se pesaron 25 g de muestra en bolsa estéril y contaminó con 1 mL de la dilución  $10^1$ )
- Primer enriquecimiento en medio líquido selectivo (selectividad dada por la concentración de NaCl al 2%): La muestra de 25 g en la bolsa estéril, se hidrató con 90 mL de agua peptonada salina (APAS) suplementada con 2% de NaCl. Posteriormente se incubó a 37°C por 6 h  $\pm$  1 h.
- Segundo enriquecimiento en medio líquido selectivo (selectividad dada por la temperatura de incubación de 41,5°C): Terminado el primer período de incubación se

transfirió 1 mL de cultivo a un tubo que contenga 10 mL de APAS, el que fue incubado a  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $18 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$  en baño termoregulado.

- Aislamiento en placa, en agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (TCBS) de uso obligatorio, y un segundo agar a elección del laboratorio, que correspondió a un agar cromogénico. Se sembró por agotamiento una porción de los cultivos obtenidos sobre la superficie de placas de agar TCBS y agar cromogénico de modo de obtener colonias aisladas. Incubándolas en posición invertida a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ . Pasado el tiempo de incubación se marcaron las colonias típicas en la base de la placa (colonias lisas, verdes (sacarosa negativas) y de 2 mm a 3 mm de diámetro).
- Confirmación por pruebas bioquímicas: Se seleccionaron 5 colonias típicas (o las disponibles) y fueron sembradas en placas de agar nutritivo salino, para obtener colonias aisladas. Se procedió a la incubación a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ . Desde las placas de agar nutritivo salino, se seleccionaron colonias típicas para la confirmación a través de las siguientes pruebas: Reacción oxidasa, Tinción de Gram y movilidad, Prueba con Agar TSI Salino, Detección de ornitina decarboxilasa, Detección de L-lisina decarboxilasa, Detección de arginina dehidrolasa, Detección de Beta-galactosidasa, Detección del indol, Tolerancia a la sal. De igual forma se realizaron controles de esterilidad de los medios según indica el método.

### **3.1.3 Metodología Cuantitativa**

Se realizó bajo la Norma para *V. parahaemolyticus* perteneciente al “Bacteriological Analytical Manual” (BAM) y consta de las siguientes etapas:

- Para las muestras de salmón se pesaron 50 g luego se adicionaron 450 mL de buffer fosfato salino (BFS), pH: 7,4 medido con pH-metro Hanna Hi 111, y homogeneizó por 1 minuto. Para el caso de moluscos, se extrajo todo el contenido interior de 12 piezas, se pesaron y se adicionó igual cantidad de BFS para después homogeneizar (esto será igual a la dilución 1:2). La dilución  $10^{-1}$  correspondió a transferir 20 g de la dilución 1:2 a 80 mL de BFS.
- Se inocularon 3 tubos que tenían 10 mL de agua peptonada alcalina (APA) de doble concentración de sal, con 10 mL de la dilución  $10^{-1}$ . De igual forma se inocularon 3 tubos

que contenían 10 mL de agua peptonada alcalina (APA) de simple concentración con 1 mL de la misma dilución.

Para los tubos de APA simple, se realizaron tres diluciones a partir de la dilución  $10^{-1}$ . La dilución  $10^{-2}$  fue el resultado de traspasar 1 mL de la dilución  $10^{-1}$  a 9 mL de agua destilada estéril, y después transferir 1 mL desde este último tubo y traspasarlo a 10 mL de caldo APA simple. Posteriormente, la dilución  $10^{-3}$ , se realizó traspasando 1 mL del tubo con agua destilada, usado para realizar la dilución  $10^{-2}$ , a un tercer tubo con 9 mL de igual contenido, para traspasar 1 mL de este último, a 10 mL de caldo APA simple. Finalmente se realizó el mismo procedimiento con la dilución  $10^{-4}$ . Se incubó a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. La turbidez de cada serie de diluciones fue utilizada para leer el resultado en la Tabla del NMP del método.

- Después de la incubación se procedió al aislamiento presuntivo, para esto se sembró por estría una asada desde 1 cm de la superficie de caldo contenido en los tubos, en agar TCBS. Se procedió a la incubación a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.
- Para la confirmación se seleccionaron 2 o más colonias típicas o sospechosas y traspasaron a TSA inclinado suplementado con una concentración de NaCl al 2% y a caldo TSB igualmente suplementado. Se incubó a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Estos cultivos proporcionaron inóculo para realizar pruebas de identificación bioquímica. Las pruebas realizadas fueron las siguientes: Tinción de Gram, Agar arginina glucosa inclinado, Agar TSI, Prueba movilidad, Prueba de la oxidasa, Tolerancia a la sal. Prueba del ONPG, Fermentación de lactosa y arabinosa, Prueba de aminoácidos, Prueba de ureasa. También se realizaron controles de esterilidad de los medios según método.

#### **4 Verificación**

La verificación de los métodos se realizó bajo la Norma ISO 16140: “Microbiology of the food chain –Method validation- Part 3: Protocol for the verification of reference and alternative methods implemented in a single laboratory”

##### **4.1 Metodología Cualitativa**

El protocolo de verificación evaluó si el método ISO 21872 pudo detectar un nivel bajo de *V. parahaemolyticus* en ambas matrices. En este estudio, el laboratorio usó su propio medio

cultivo (Agar Plate Count), desde el cual se obtuvo un nivel de inóculo <30 UFC por porción. Se utilizaron 10 muestras contaminadas y 2 controles negativos por matriz evaluada. El método fue capaz de detectar el 100% de las muestras contaminadas.

#### **4.2 Metodología Cuantitativa**

El protocolo para la norma BAM, busca determinar la repetibilidad, reproducibilidad intralaboratorio, exactitud e incertidumbre. El cálculo de estas variables se desarrolló con 10 muestras de cada matriz, inoculadas en tres distintos niveles de contaminación ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ). El método fue realizado por 2 analistas, trabajando de manera independiente, por esta razón la muestra de 300 gramos fue subdividida en 2 submuestras de 150 gramos, las que a su vez se dividieron en 3 porciones de 50 gramos, con el fin de inocular cada porción con uno de los tres niveles de contaminación. La repetibilidad determinó la precisión de cada analista, es decir, que cada analista se encontrara capacitado para la realización del método, la reproducibilidad definió la precisión del trabajo en el laboratorio. Ambas se calcularon según la Norma ISO 16140 y la “Guía para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos por la técnica del Número Más Probable” perteneciente a la Comisión Federal Para la Protección contra el Riesgo Sanitario (COFEPRIS), de la Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos. El criterio de aceptación de estos parámetros es obtener una repetibilidad (r) y una reproducibilidad (R) <32% (COFEPRIS, 2013). La determinación de la exactitud se realizó comparando el recuento de colonias en un medio no selectivo, como Agar Plate Count, versus el recuento en un medio selectivo (Agar TCBS), proceso conocido como recuperación; el criterio de aceptación para este parámetro fue obtener un porcentaje de recuperación sobre 50%, tal como lo indica la Norma ISO 11133 de Medios de Cultivos. Finalmente la incertidumbre fue proporcionada por la Tabla Número Más Probable, incluida en la misma norma BAM.

#### **5 Normas de bioseguridad**

Se trabajó bajo las condiciones descritas para un nivel 2 de bioseguridad. Fue obligatorio el uso de ropa protectora, guantes protectores para los procedimientos, el uso de dispositivos de pipeteo y autoclaves validados con métodos apropiados, entre otros. Según el Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud, dicho nivel es el adecuado para trabajar con *V. parahaemolyticus* (OMS, 2005) (Ver Anexo 1).

## RESULTADOS

### 6 Metodología Cualitativa

#### 6.1 Metodología Cualitativa en Matriz Salmón

Todos los resultados obtenidos por el método ISO 21872 en las 10 muestras de salmón de 25 g cada una, fueron positivos, es decir se confirmó la presencia de *V.parahaemolyticus* en el 100% de las muestras contaminadas. Por otra parte los dos controles negativos arrojaron como resultado ausencia de la bacteria (Ver Anexo 2).

Los resultados de las pruebas para confirmación bioquímica fueron los siguientes: Reacción oxidasa positiva, Tinción de Gram negativo, Movilidad al microscopio positiva, Prueba con Agar TSI Salino reacción parte tendida alcalina (rojo), fondo ácido (amarillo), sin presencia de gas, ni ácido sulfhídrico (K/A- -), Detección de ornitina decarboxilasa positiva, Detección de L-lisina decarboxilasa positiva, Detección de arginina dehidrolasa negativa, Detección de Beta-galactosidasa negativa, Detección del indol positiva y Tolerancia a la sal con crecimiento al 3%, 6% y 8% de concentración de sal. Todos los procedimientos fueron realizados según el método ISO 21872.

#### 6.2 Metodología Cualitativa en Matriz Chorito

Los resultados obtenidos por el método ISO 21872 en las 10 muestras de chorito de 25 g cada una, al igual que en la matriz salmón, confirmaron la presencia de *V. parahaemolyticus* en la totalidad de las muestras contaminadas. De igual forma, ambos controles negativos arrojaron ausencia de la bacteria (Ver anexo 2).

Para la confirmación bioquímica se realizaron las mismas pruebas que en la matriz salmón, siguiendo el método ISO 21872.

## 7 Metodología Cuantitativa

### 7.1 Metodología Cuantitativa en Matriz Salmón

Los resultados obtenidos bajo la Norma FDA-BAM para *V. parahaemolyticus* en 10 muestras de salmón de 50 g cada una, se detallan en Tabla 1 y 2.

**Tabla 1.** Resultados NMP/g obtenidos por el primer analista en las muestras de salmón (N° 1 a 10) bajo la Norma BAM para *V. parahaemolyticus*.

Número Muestra	Resultados expresados en NMP/g según Nivel de Contaminación		
	Primer Nivel 10 <sup>1</sup>	Segundo Nivel 10 <sup>2</sup>	Tercer Nivel 10 <sup>3</sup>
1	21	120	1200
2	43	390	2100
3	39	210	1500
4	61	150	4600
5	39	210	2400
6	43	150	1600
7	72	210	1200
8	39	120	2400
9	73	390	1200
10	43	430	2100

**Tabla 2.** Resultados NMP/g obtenidos por el segundo analista en las muestras de salmón (N° 1b a 10b) bajo la Norma BAM para *V. parahaemolyticus*.

Número Muestra	Resultados expresados en NMP/g según Nivel de Contaminación		
	Primer Nivel 10 <sup>1</sup>	Segundo Nivel 10 <sup>2</sup>	Tercer Nivel 10 <sup>3</sup>
<b>1b</b>	26	150	1500
<b>2b</b>	73	350	2100
<b>3b</b>	43	150	2400
<b>4b</b>	72	210	4600
<b>5b</b>	61	160	1600
<b>6b</b>	61	200	1500
<b>7b</b>	39	390	1200
<b>8b</b>	45	210	4600
<b>9b</b>	72	350	1200
<b>10b</b>	43	460	2400

Los resultados de las pruebas para confirmación bioquímica fueron los siguientes: Tinción de Gram negativo, Agar arginina glucosa inclinado reacción alcalina (púrpura) en superficie y ácido (amarillo) en profundidad, sin gas, ni producción de ácido sulfhídrico (K/a- -), Agar TSI reacción alcalina en superficie (rojo) y ácido (amarillo) en profundidad, sin gas, ni producción de ácido sulfhídrico (K/A- -), Prueba movilidad positiva, Prueba de la oxidasa positiva, Tolerancia a la sal con crecimiento a concentraciones de sal al 3%, 6% y 8%. Prueba del ONPG negativa, Fermentación de lactosa negativa y arabinosa positiva, Prueba de aminoácidos (arginina dihidrolasa negativa, lisina decarboxilasa positiva, ornitina decarboxilasa positiva), Prueba de ureasa variable. Todos los procedimientos fueron realizados según la norma FDA-BAM para *V. parahaemolyticus*.

## 7.2 Metodología Cuantitativa en Matriz Chorito

Los resultados obtenidos bajo la Norma FDA-BAM para *V. parahaemolyticus* en 10 muestras del contenido interior de 12 piezas de chorito cada una, con sus respectivos tres niveles de contaminación, se detallan en Tabla 3 y 4.

**Tabla 3.** Resultados NMP/g obtenidos por el primer analista en muestras de chorito (N° 11 a 20) bajo la Norma BAM para *V. parahaemolyticus*.

Número Muestra	Resultados expresados en NMP/g según Nivel de Contaminación		
	Primer Nivel 10 <sup>1</sup>	Segundo Nivel 10 <sup>2</sup>	Tercer Nivel 10 <sup>3</sup>
11	39	210	4600
12	72	290	1600
13	29	290	1200
14	35	210	2400
15	43	640	2100
16	39	150	1200
17	35	390	1500
18	73	290	2100
19	35	350	2400
20	29	270	4600

**Tabla 4.** Resultados NMP/g obtenidos por el segundo analista en muestras de chorito (N° 11b a 20b) bajo la Norma BAM para *V. parahaemolyticus*.

Número Muestra	Resultados expresados en NMP/g según Nivel de Contaminación		
	Primer Nivel 10 <sup>1</sup>	Segundo Nivel 10 <sup>2</sup>	Tercer Nivel 10 <sup>3</sup>
<b>11b</b>	35	390	4600
<b>12b</b>	64	210	1600
<b>13b</b>	20	290	1500
<b>14b</b>	39	240	2900
<b>15b</b>	43	750	2400
<b>16b</b>	35	290	1600
<b>17b</b>	39	430	1500
<b>18b</b>	64	750	2100
<b>19b</b>	39	340	2900
<b>20b</b>	35	750	4600

Se realizaron las mismas pruebas de confirmación bioquímica y esterilidad que en la matriz anterior. Todos los procedimientos fueron realizados según la norma FDA-BAM para *V. parahaemolyticus*.

## VERIFICACIÓN

### 8 Método Cualitativo ambas Matrices

Todas las muestras contaminadas dieron como resultado presencia de *V. parahaemolyticus* y los controles negativos de ambas matrices ausencia de la bacteria.

Se sembró en Agar Recuento en Placa 1 mL de inóculo, obteniendo como resultado en todas las muestras un número <30 UFC de *Vibrio parahaemolyticus* (Ver anexo 3). Por lo tanto se verifica la implementación del método para ambas matrices.

## 9 Método Cuantitativo Matriz Salmón

### 9.1 Repetibilidad

Se calculó mediante Método ISO 16140 y la “Guía para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos por la técnica del Número Más Probable” perteneciente a la COFEPRIS. Los resultados de cada analista fueron sometidos a función logarítmica, para luego mediante el cociente entre la desviación estándar y el promedio multiplicado por 100, obtener el coeficiente de variación. El cual fue corregido por la constante “2,8”, correspondiente al valor de “Z” en una distribución normal de datos con una confianza del 95%, dando como resultado la repetibilidad (r). El resultado de (r) debe ser <32% para cumplir con la verificación. Al multiplicar el coeficiente de variación por el valor de “Z” con una confianza de 95%, se busca normalizar los resultados con el fin de asegurar que los valores obtenidos sean por causa de la contaminación realizada y no por otros factores. Los resultados se detallan en las Tablas 5, 6 y 7.

**Tabla 5.** Cálculo de Repetibilidad (r). 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> Analista en 1<sup>er</sup> Nivel de contaminación (Ver anexo 4).

	<b>1<sup>er</sup> Analista</b>	<b>2<sup>do</sup> Analista</b>
<b>MEDIA</b>	1,650	1,707
<b>DESVEST</b>	0,158	0,147
<b>C.V</b>	9,6%	8,6%
<b>r</b>	<b>26,9%</b>	<b>24,1%</b>

**Tabla 6.** Repetibilidad (r). 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> Analista en 2<sup>do</sup> Nivel de contaminación (Ver anexo 5).

	<b>1<sup>er</sup> Analista</b>	<b>2<sup>do</sup> Analista</b>
<b>MEDIA</b>	2,329	2,384
<b>DESVEST</b>	0,211	0,184
<b>C.V</b>	9,1%	7,7%
<b>r</b>	<b>25,4%</b>	<b>21,6%</b>

**Tabla 7.** Repetibilidad (r). 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> Analista en 3<sup>er</sup> Nivel de contaminación (Ver anexo 6).

	<b>1<sup>er</sup> Analista</b>	<b>2<sup>do</sup> Analista</b>
<b>MEDIA</b>	3,269	3,312
<b>DESVEST</b>	0,185	0,214
<b>C.V</b>	5,6%	6,5%
<b>r</b>	<b>15,8%</b>	<b>18,1%</b>

## 9.2 Reproducibilidad

Se calculó mediante Método ISO 16140 y la “Guía para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos por la técnica del Número Más Probable” perteneciente a la COFEPRIS. Los coeficientes de variación de ambos analistas, obtenidos en la repetibilidad, fueron promediados y corregidos por el valor de “Z” en una distribución normal de datos con una confianza del 95% (2,8), dando como resultado la reproducibilidad (R). El resultado de R debe ser <32% en todos los niveles de contaminación para cumplir con la verificación. El resultado se detalla en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Cálculo de la Reproducibilidad (R) en cada nivel de contaminación.

	<b>1<sup>er</sup> Nivel de Contaminación</b>			<b>2<sup>do</sup> Nivel de Contaminación</b>			<b>3<sup>er</sup> Nivel de Contaminación</b>		
	<b>CV</b>	<b>MEDIA</b>	<b>R</b>	<b>CV</b>	<b>MEDIA</b>	<b>R</b>	<b>CV</b>	<b>MEDIA</b>	<b>R</b>
<b>1<sup>er</sup> Analista</b>	9,6%	9,1%	<b>25,48%</b>	9,1%	8,44%	<b>23,52%</b>	5,6%	6,05%	<b>16,94%</b>
<b>2<sup>do</sup> Analista</b>	8,6%			7,7%			6,5%		

### 9.3 Exactitud

La exactitud se calculó mediante la Norma de Medios de Cultivo ISO 11133 (ISO, 2014b). En la cual se indica que el cálculo de la exactitud se llevará a cabo mediante el proceso conocido como “Recuperación”. Este consiste en la comparación de los recuentos de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) entre un agar no específico y otro específico. Se debe obtener un Porcentaje de Recuperación (PR) >50%, es decir, el medio de cultivo específico debió ser capaz de recuperar sobre el 50% de las colonias crecidas en el medio no selectivo para cumplir con la verificación. Esta operación se realizó para cada nivel de contaminación y para cada analista (Tablas 9 y 10). El agar específico para *V. parahaemolyticus* es Agar TCBS y como agar no específico se utilizó Agar Recuento en Placa (ARP).

**Tabla 9.** Cálculo del Porcentaje de Recuperación (PR) en cada nivel de contaminación del 1<sup>er</sup> analista.

1 <sup>er</sup> Analista	1 <sup>er</sup> Nivel de contaminación			2 <sup>do</sup> Nivel de contaminación			3 <sup>er</sup> Nivel de contaminación		
	ARP	TCBS	PR	ARP	TCBS	PR	ARP	TCBS	PR
<b>1</b>	26	18	<b>69%</b>	288	212	<b>74%</b>	2812	1900	<b>68%</b>
<b>2</b>	28	21	<b>75%</b>	280	204	<b>73%</b>	3004	2112	<b>70%</b>
<b>3</b>	24	15	<b>63%</b>	252	180	<b>71%</b>	2596	1904	<b>73%</b>
<b>4</b>	27	20	<b>74%</b>	284	208	<b>73%</b>	2704	1908	<b>71%</b>
<b>5</b>	28	20	<b>71%</b>	270	192	<b>71%</b>	3112	2212	<b>71%</b>
<b>6</b>	16	12	<b>75%</b>	160	104	<b>65%</b>	1812	1104	<b>61%</b>
<b>7</b>	20	13	<b>65%</b>	212	132	<b>62%</b>	2408	1508	<b>63%</b>
<b>8</b>	23	14	<b>61%</b>	244	160	<b>66%</b>	2716	1816	<b>67%</b>
<b>9</b>	29	21	<b>72%</b>	290	208	<b>72%</b>	2808	1908	<b>68%</b>
<b>10</b>	24	16	<b>67%</b>	228	156	<b>68%</b>	2516	1812	<b>72%</b>
<b>Promedio</b>			<b>69%</b>			<b>70%</b>			<b>68%</b>

**Tabla 10.** Cálculo del Porcentaje de Recuperación (PR) en cada nivel de contaminación del 2<sup>do</sup> analista.

2 <sup>do</sup> Analista	1 <sup>er</sup> Nivel de contaminación			2 <sup>do</sup> Nivel de contaminación			3 <sup>er</sup> Nivel de contaminación		
	N° muestra	ARP	TCBS	PR	ARP	TCBS	PR	ARP	TCBS
<b>1b</b>	24	16	<b>67%</b>	260	176	<b>68%</b>	2808	1908	<b>68%</b>
<b>2b</b>	26	19	<b>73%</b>	264	188	<b>71%</b>	2704	1896	<b>71%</b>
<b>3b</b>	27	18	<b>67%</b>	288	224	<b>78%</b>	2416	1708	<b>70%</b>
<b>4b</b>	24	16	<b>67%</b>	228	172	<b>75%</b>	2308	1816	<b>79%</b>
<b>5b</b>	23	17	<b>74%</b>	220	148	<b>67%</b>	2512	1704	<b>68%</b>
<b>6b</b>	19	13	<b>68%</b>	192	134	<b>70%</b>	2096	1612	<b>77%</b>
<b>7b</b>	22	15	<b>68%</b>	228	152	<b>67%</b>	2204	1588	<b>72%</b>
<b>8b</b>	25	17	<b>68%</b>	248	180	<b>73%</b>	2480	1600	<b>65%</b>
<b>9b</b>	29	21	<b>72%</b>	240	192	<b>80%</b>	2208	1492	<b>68%</b>
<b>10b</b>	21	15	<b>71%</b>	224	152	<b>68%</b>	2388	1604	<b>67%</b>
<b>Promedio</b>			<b>70%</b>			<b>71%</b>			<b>70%</b>

#### 9.4 Incertidumbre

El valor de la incertidumbre determinó el intervalo de resultados donde se encuentra el valor verdadero de la medición. Este cálculo viene incluido en la Tabla del Número Más Probable de la Norma FDA-BAM para *V. parahaemolyticus*. (Ver anexo 10).

### 10 Método Cuantitativo Matriz Chorito

#### 10.1 Repetibilidad

Al igual que en la matriz anterior, se realizó el cálculo de esta variable mediante el Método ISO 16140 y la “Guía para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos por la técnica del Número Más Probable” perteneciente a la COFEPRIS. Los resultados se detallan en las Tablas 11, 12 y 13.

**Tabla 11.** Cálculo de Repetibilidad (r). 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> Analista en 1<sup>er</sup> Nivel de contaminación matriz chorito (Ver anexo 7).

	<b>1<sup>er</sup> Analista</b>	<b>2<sup>do</sup> Analista</b>
<b>MEDIA</b>	1, 609	1,595
<b>DESVEST</b>	0,143	0,143
<b>C.V</b>	8,9%	9%
<b>r</b>	<b>24,8%</b>	<b>25,2%</b>

**Tabla 12.** Repetibilidad (r). 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> Analista en 2<sup>do</sup> Nivel de contaminación matriz chorito (Ver anexo 8).

	<b>1<sup>er</sup> Analista</b>	<b>2<sup>do</sup> Analista</b>
<b>MEDIA</b>	2, 458	2,601
<b>DESVEST</b>	0,171	0,210
<b>C.V</b>	7%	8,1%
<b>r</b>	<b>19,5%</b>	<b>22,6%</b>

**Tabla 13.** Repetibilidad (r). 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> Analista en 3<sup>er</sup> Nivel de contaminación matriz chorito (Ver anexo 9)

	<b>1<sup>er</sup> Analista</b>	<b>2<sup>do</sup> Analista</b>
<b>MEDIA</b>	3, 327	3,371
<b>DESVEST</b>	0,209	0,189
<b>C.V</b>	6,3%	5,6%
<b>r</b>	<b>17,6%</b>	<b>15,7%</b>

## 10.2 Reproducibilidad

Al igual que en la matriz salmón, se realizó el cálculo de esta variable mediante el Método ISO 16140 y la “Guía para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos por la técnica del Número Más Probable” perteneciente a la COFEPRIS. Donde el promedio de los coeficientes de variación de ambos analistas se multiplicó por el valor de distribución “Z” con un 95% de confianza (2,8). Los resultados se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Cálculo de la Reproducibilidad (R) en cada nivel de contaminación.

	1 <sup>er</sup> Nivel de Contaminación			2 <sup>do</sup> Nivel de Contaminación			3 <sup>er</sup> Nivel de Contaminación		
	CV	MEDIA	R	CV	MEDIA	R	CV	MEDIA	R
<b>1<sup>er</sup> Analista</b>	8,9%	8,95%	<b>25,06%</b>	7,0%	7,55%	<b>21,14%</b>	6,3%	5,95%	<b>16,66%</b>
<b>2<sup>do</sup> Analista</b>	9,0%			8,1%			5,6%		

## 10.3 Exactitud

Se calculó de igual forma que en la matriz salmón, siguiendo la Norma de Medios de Cultivo ISO 11133. El procedimiento se realizó para cada nivel de contaminación y para ambos analistas (Tablas 15 y 16).

**Tabla 15.** Cálculo del Porcentaje de Recuperación (PR) en cada nivel de contaminación en matriz chorito para el 1<sup>er</sup> analista.

1 <sup>er</sup> Analista	1 <sup>er</sup> Nivel de contaminación			2 <sup>do</sup> Nivel de contaminación			3 <sup>er</sup> Nivel de contaminación		
	ARP	TCBS	PR	ARP	TCBS	PR	ARP	TCBS	PR
<b>11</b>	28	18	<b>64%</b>	264	180	<b>68%</b>	2904	1796	<b>62%</b>
<b>12</b>	25	17	<b>68%</b>	248	172	<b>69%</b>	2496	1708	<b>68%</b>
<b>13</b>	23	16	<b>70%</b>	288	192	<b>67%</b>	2416	1736	<b>72%</b>
<b>14</b>	26	18	<b>69%</b>	236	168	<b>71%</b>	2504	1512	<b>60%</b>
<b>15</b>	18	13	<b>72%</b>	192	132	<b>69%</b>	2108	1396	<b>66%</b>

<b>16</b>	21	15	<b>71%</b>	244	176	<b>72%</b>	2196	1508	<b>69%</b>
<b>17</b>	27	18	<b>67%</b>	268	180	<b>67%</b>	2712	1904	<b>70%</b>
<b>18</b>	23	14	<b>61%</b>	220	136	<b>62%</b>	2416	1512	<b>63%</b>
<b>19</b>	26	17	<b>65%</b>	276	192	<b>70%</b>	2696	2096	<b>78%</b>
<b>20</b>	24	17	<b>71%</b>	228	164	<b>72%</b>	2412	1704	<b>71%</b>
<b>Promedio</b>			<b>68%</b>			<b>69%</b>			<b>68%</b>

**Tabla 16.** Cálculo del Porcentaje de Recuperación (PR) en cada nivel de contaminación en matriz chorito para el 2<sup>do</sup> analista.

<b>2<sup>do</sup> Analista</b>	<b>1<sup>er</sup> Nivel de contaminación</b>			<b>2<sup>do</sup> Nivel de contaminación</b>			<b>3<sup>er</sup> Nivel de contaminación</b>		
	<b>N° muestra</b>	<b>ARP</b>	<b>TCBS</b>	<b>PR</b>	<b>ARP</b>	<b>TCBS</b>	<b>PR</b>	<b>ARP</b>	<b>TCBS</b>
<b>11b</b>	26	18	<b>69%</b>	288	188	<b>65%</b>	2912	1908	<b>66%</b>
<b>12b</b>	26	17	<b>65%</b>	256	176	<b>69%</b>	2404	1652	<b>69%</b>
<b>13b</b>	24	15	<b>63%</b>	276	168	<b>61%</b>	2928	1824	<b>62%</b>
<b>14b</b>	28	19	<b>68%</b>	292	188	<b>64%</b>	2508	1896	<b>76%</b>
<b>15b</b>	23	15	<b>65%</b>	220	172	<b>78%</b>	2296	1728	<b>75%</b>
<b>16b</b>	22	15	<b>68%</b>	272	180	<b>66%</b>	2836	2048	<b>72%</b>
<b>17b</b>	24	16	<b>67%</b>	264	192	<b>73%</b>	2412	1852	<b>77%</b>
<b>18b</b>	25	18	<b>72%</b>	288	190	<b>66%</b>	2608	1592	<b>61%</b>
<b>19b</b>	27	20	<b>74%</b>	268	176	<b>66%</b>	2804	1944	<b>69%</b>
<b>20b</b>	23	17	<b>74%</b>	248	168	<b>68%</b>	2512	1588	<b>63%</b>
<b>Promedio</b>			<b>69%</b>			<b>68%</b>			<b>69%</b>

#### **10.4 Incertidumbre**

Para la obtención de la Incertidumbre se utilizó la Tabla NMP perteneciente a la Norma FDA-BAM para *V. parahaemolyticus* (Anexo 10).

## DISCUSIÓN

La presencia de *V. parahaemolyticus* en productos hidrobiológicos ha sido identificada a lo largo de todo el mundo. Es uno de los principales agentes detectados en las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) en el país, entre los que también destacan *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, entre otros. En Chile los antecedentes revelan que la bacteria se encuentra presente en todas las regiones, produciendo brotes epidémicos, siendo estos de notificación obligatoria según lo establecido en el Decreto 158 de 2004, debiendo ser informados a la SEREMI correspondiente, quién notificará al Departamento de Epidemiología del MINSAL el número de casos semanales.

En el caso de esta memoria, el propósito de la verificación de ambas metodologías referenciales, fue comprobar que el laboratorio logró dominar y utilizar los métodos de forma correcta. La importancia de implementar métodos referenciales radica en la significancia de los resultados obtenidos, ya que al contar con el respaldo del proceso de validación por organismos de acreditación internacional son considerados como confiables (ISP, 2010).

El método cualitativo en ambas matrices detectó el 100% de las muestras contaminadas como positivas y todos los controles negativos arrojaron ausencia para la bacteria. Se logró detectar un nivel muy bajo de inóculo <30 UFC, por lo que se puede señalar que el laboratorio fue capaz de trabajar con un nivel de sensibilidad óptimo. Se confirmó *V. parahaemolyticus* en todas las muestras a través de las pruebas bioquímicas.

Para el caso de la metodología cuantitativa se observó directa relación entre los resultados obtenidos en la Tabla NMP y el nivel con el que se contaminaron las muestras. Esto significa que estamos frente a un análisis cuantificable, el que podría permitir identificar estimaciones de valores de concentración desde los resultados de análisis de turbidez de los tubos NMP. Al igual que en el método cualitativo se confirmó *V. parahaemolyticus* en todas las muestras a través de las pruebas bioquímicas.

En relación a los resultados obtenidos en los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad en ambas matrices, en el 3<sup>er</sup> nivel de contaminación se observaron valores porcentuales menores en comparación a los otros niveles, esto fue considerado como esperable, ya que en este nivel al existir una mayor concentración de inóculo, se obtuvo mayor cantidad de tubos y series positivas en cuanto a turbidez, repercutiendo en una menor dispersión de los resultados entregados por la Tabla NMP perteneciente a la norma BAM-FDA.

Gracias a los resultados obtenidos en los controles negativos, se pudo determinar que la matriz inicial se encontraba libre de *V. parahaemolyticus* o cualquier otra especie perteneciente al género *Vibrio spp*, ya que el agar utilizado para su crecimiento (Agar TCBS) es altamente selectivo incluso permite diferenciar entre las especies del género, cumple con los requisitos nutritivos y permite que los vibrios compitan con otros patógenos. La alta concentración de sodio favorece el crecimiento especialmente de las bacterias halofílicas, como lo es el *V. parahaemolyticus*.

Como consecuencia del desarrollo de esta memoria se puede determinar que ambos métodos son reproducibles en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, es decir, cuenta con las condiciones necesarias para la correcta utilización de los métodos, desde materiales, limpieza y adecuado funcionamiento interno.

## CONCLUSIONES

- Ambas metodologías, tanto cualitativa como cuantitativa, cumplieron a cabalidad con el proceso de verificación definido por la norma ISO 16140, es decir, fueron reproducibles, esto quiere decir que el laboratorio, bajo sus condiciones de trabajo, fue capaz de obtener resultados similares y coherentes para cada método.
- En el método cualitativo se logró detectar un nivel muy bajo de inóculo (<30UFC). A su vez en el método cuantitativo los resultados obtenidos lograron directa relación con el nivel de contaminación, detectando incluso recuentos de 20 NMP/g, en el primer nivel. Por lo tanto, el laboratorio trabaja con un nivel de sensibilidad adecuado para la implementación de estos métodos.
- El trabajo realizado demuestra que el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos del Departamento de Medicina Preventiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, puede responder satisfactoriamente a las nuevas demandas definidas por los mercados nacionales e internacionales.

## BIBLIOGRAFÍA

**COFEPRIS. COMISIÓN FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA RIESGOS SANITARIOS.** 2013. Guía para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos por la técnica del número más probable. Distrito Federal, México. 14 p. Secretaria de Salud.

**FAO/ OMS. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN /ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2004. Garantía de la inocuidad y calidad de los alimentos: directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos. Ginebra, Suiza. 94 p.

**FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.** 2005. Perfiles sobre la pesca y la acuicultura por países. La República de Chile. Ginebra, Suiza. 10 p.

**FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.** 2007. Actas de Pesca y Acuicultura: Normativa aplicada al cultivo de bivalvos en Chile. Roma, Italia. (12) 199–204

**FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2014. Sanitary and Phytosanitary Measures (SPS). 1 (1): 115:120.

**FICA, A.** 2007. Infecciones por *Vibrio parahaemolyticus*. Medwave. 7(9): 2544- 2550.

**FIP. FONDO DE INVESTIGACIÓN PESQUERA.** 2008. Programación y análisis de información biológica y oceanográfica obtenida a través del programa de sanidad de moluscos bivalvos (PSMB). Valparaíso, Chile. 437 p.

**FORNÉS, D.** 2014. Metodología para validación interna de métodos de ensayo microbiológicos alternativos en alimentos. In: Validación de métodos microbiológicos. Santiago, Chile. 26-27 marzo 2014. Agencia Chilena para la calidad e inocuidad alimentaria (ACHIPIA), Ministerio de Agricultura. pp. 17-20.

**HEITMANN, I.; JOFRÉ, L.; HORMÁZABAL, C.; OLEA, A.; VALLEBUONA, C.; VALDÉS, C.** 2005. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. Rev Chilena Infectol. 22 (2): 131-140.

**ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.** 2007.

Norma ISO 16140: “Microbiology of the food chain –Method validation- Part 3: Protocol for the verification of reference and alternative methods implemented in a single laboratory

**ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.** 2014a. [En línea] < <http://www.iso.org/iso/home.html>> [consulta: 09- 09-2014].

**ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.** 2014b. Norma ISO 11133: “Preparation, production, storage and performance testing of culture media”

**ISP. INSTITUTO SALUD PÚBLICA.** 2010. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”. Santiago, Chile. 70 p.

**ISP. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA.** 2014. *Vibrio parahaemolyticus*. [En línea] < <http://www.ispch.cl/vibrio-parahaemolyticus>> [consulta: 09- 09-2014].

**KOPPER, G.** 2009. Estimación del impacto socio-económico de las enfermedades transmitidas por alimentos en Costa Rica. Rev. Cacia. [En línea] <<http://www.uci.ac.cr/descargas/MIA/Articulo%20CACIA%20impacto%20ETA%20rev.pdf>> [consulta: 10- 09-2014].

**LUPIN, H.; CACHICAS, V.; COSTARRICA, L.; RIVERA I.** 2008. Evaluación de Riesgo Microbiológico (ERM) por presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en bivalvos. In: XXX Congreso Chileno de Microbiología. Diciembre 2-4 Concepción, Chile.

**MINSAL. MINISTERIO DE SALUD.** 2014. Informe de situación: Brotes enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA). Chile, semana epidemiológica (SE) 1 a 21 año 2014. Santiago, Chile. 6 p.

**OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2005. Manual de bioseguridad en el Laboratorio. OMS. Ginebra, Suiza. pp 9-20

**QUIÑÓÑEZ, E.; QUIRÓZ, C.; ZAMORA, D.** 2005. *Vibrio parahaemolyticus*: A Silent Aquatic Enemy. v.6 [En línea] < [http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art33/abr\\_art33.pdf](http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art33/abr_art33.pdf) > [consulta: 09- 03-2015]

**ROZAS, C.** 2010. Avances en los Sistemas de Aseguramiento de Calidad y de detección de contaminantes para productos del mar en Chile. In: Gira de la Inocuidad Alimentaria, INOFOOD 2010. 10 de Noviembre 2010. Santiago, Chile.

**SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA.** 2007a. Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB). [En línea] <  
[http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_content&view=article&id=261:programa-de-sanidad-de-moluscos-bivalvos&catid=83:mobilvalvos&Itemid=461](http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=261:programa-de-sanidad-de-moluscos-bivalvos&catid=83:mobilvalvos&Itemid=461) > [Consulta: 14-12-2014].

**SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA.** 2007b. Programa de Aseguramiento de la Calidad (PAC) para Plantas Pesqueras y Buques Factorías. [En línea].  
<[http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_content&task=view&id=273&Itemid=474](http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_content&task=view&id=273&Itemid=474) > [Consulta: 14-12-2014].

## ANEXOS

### ANEXO 1



### CERTIFICADO N° 55

Santiago 31 de agosto del 2015

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto de memoria titulado: "Implementación y Verificación de un Método Cualitativo y uno Cuantitativo para la Detección y Recuento de *Vibrio parahaemolyticus* en Productos Hidrobiológicos", del alumno Sr. Edson Pincheira V., y que corresponde a su proyecto de memoria para optar al título de Médico Veterinario. Profesor Guía Dra. Pilar Oviedo.

En el proyecto se estipulan entre otras, las siguientes medidas de Bioseguridad:

- 1.- El Personal recibirá una inducción en normas de bioseguridad y entrenamiento en el trabajo de laboratorio. Se utilizará vestimenta y equipos adecuados para realizar el trabajo en el laboratorio.
- 2.- Uso de gabinete de bioseguridad clase 2, desinfección de mesones en forma adecuada.
- 3.- Los desechos biológicos serán eliminados adecuadamente. Los desechos químicos también serán eliminados adecuadamente.

El proyecto de memoria de título fue revisado por el comité en base a las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas de Bioseguridad" editado por CONICYT versión 2008 y que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.

  
LISETTE LAPIERRE ACEVEDO  
Coordinadora  
Comité de Bioseguridad



## ANEXO 2

Resultados Método Cualitativo. Matriz Salmón: Muestras 01 a 010, controles negativos: Muestras 001 – 002. Matriz Chorito: Muestras 011 a 020, controles negativos: Muestras 003 – 004.

<b>Muestra Número</b>	<b>Resultado</b>
<b>01</b>	Presencia
<b>02</b>	Presencia
<b>03</b>	Presencia
<b>04</b>	Presencia
<b>05</b>	Presencia
<b>06</b>	Presencia
<b>07</b>	Presencia
<b>08</b>	Presencia
<b>09</b>	Presencia
<b>010</b>	Presencia
<b>001</b>	Ausencia
<b>002</b>	Ausencia

<b>Muestra Número</b>	<b>Resultado</b>
<b>011</b>	Presencia
<b>012</b>	Presencia
<b>013</b>	Presencia
<b>014</b>	Presencia
<b>015</b>	Presencia
<b>016</b>	Presencia
<b>017</b>	Presencia
<b>018</b>	Presencia
<b>019</b>	Presencia
<b>020</b>	Presencia
<b>003</b>	Ausencia
<b>004</b>	Ausencia

### ANEXO 3

Recuento de colonias en agar Plate Count (ARP) obtenidas del inóculo utilizado en Metodología Cualitativa ( $10^1$ ). Matriz Salmón: Muestras 01 a 010. Matriz Chorito: Muestras 011 a 020.

<b>Muestra Número</b>	<b>Resultado Recuento</b>
01	16
02	19
03	23
04	13
05	14
06	27
07	21
08	24
09	18
010	12

<b>Muestra Número</b>	<b>Resultado Recuento</b>
011	21
012	12
013	15
014	26
015	19
016	11
017	13
018	25
019	20
020	16

#### ANEXO 4

Resultados Método Cuantitativo Matriz Salmón. Primer Nivel de Contaminación: Primer Analista (Muestras 1 a 10). Segundo Analista (Muestra 1b a 10b).

<b>N° Muestra</b>	<b>NMP/g</b>	<b>Log</b>
1	21	1,322
2	43	1,633
3	39	1,591
4	61	1,785
5	39	1,591
6	43	1,633
7	72	1,857
8	39	1,591
9	73	1,863
10	43	1,633
	<b>MEDIA</b>	1,650
	<b>DESVEST</b>	0,158
	<b>C.V</b>	9,6%
	<b>r</b>	<b>26,9%</b>

<b>N° Muestra</b>	<b>NMP/g</b>	<b>Log</b>
1b	26	1,415
2b	73	1,863
3b	43	1,633
4b	72	1,857
5b	61	1,785
6b	61	1,785
7b	39	1,591
8b	45	1,653
9b	72	1,857
10b	43	1,633
	<b>MEDIA</b>	1,707
	<b>DESVEST</b>	0,147
	<b>C.V</b>	8,6%
	<b>r</b>	<b>24,1%</b>

## ANEXO 5

Resultados Método Cuantitativo Matriz Salmón. Segundo Nivel de Contaminación: Primer Analista (Muestras 1 a 10). Segundo Analista (Muestra 1b a 10b).

Nº Muestra	NMP/g	Log
1	120	2,079
2	390	2,591
3	210	2,322
4	150	2,176
5	210	2,322
6	150	2,176
7	210	2,322
8	120	2,079
9	390	2,591
10	430	2,633
	<b>MEDIA</b>	2,329
	<b>DESVEST</b>	0,211
	<b>C.V</b>	9,1%
	<b>r</b>	<b>25,4%</b>

Nº Muestra	NMP/g	Log
1b	150	2,176
2b	350	2,544
3b	150	2,176
4b	210	2,322
5b	160	2,204
6b	200	2,301
7b	390	2,591
8b	210	2,322
9b	350	2,544
10b	460	2,663
	<b>MEDIA</b>	2,384
	<b>DESVEST</b>	0,184
	<b>C.V</b>	7,7%
	<b>r</b>	<b>21,6%</b>

## ANEXO 6

Resultados Método Cuantitativo Matriz Salmón. Tercer Nivel de Contaminación: Primer Analista (Muestras 1 a 10). Segundo Analista (Muestra 1b a 10b).

<b>N° Muestra</b>	<b>NMP/g</b>	<b>Log</b>
1	1200	3,079
2	2100	3,322
3	1500	3,176
4	4600	3,663
5	2400	3,380
6	1600	3,204
7	1200	3,079
8	2400	3,380
9	1200	3,079
10	2100	3,322
	<b>MEDIA</b>	3,269
	<b>DESVEST</b>	0,185
	<b>C.V</b>	5,6%
	<b>r</b>	15,8%

<b>N° Muestra</b>	<b>NMP/g</b>	<b>Log</b>
1b	1500	3,176
2b	2100	3,322
3b	2400	3,380
4b	4600	3,663
5b	1600	3,204
6b	1500	3,176
7b	1200	3,079
8b	4600	3,663
9b	1200	3,079
10b	2400	3,380
	<b>MEDIA</b>	3,312
	<b>DESVEST</b>	0,214
	<b>C.V</b>	6,5%
	<b>r</b>	18,1%

## ANEXO 7

Resultados Método Cuantitativo Matriz Chorito. Primer Nivel de Contaminación: Primer Analista (Muestras 11 a 20). Segundo Analista (Muestra 11b a 20b).

Nº Muestra	NMP/g	Log
11	39	1,591
12	72	1,857
13	29	1,462
14	35	1,544
15	43	1,633
16	39	1,591
17	35	1,544
18	73	1,863
19	35	1,544
20	29	1,462
	<b>MEDIA</b>	1,609
	<b>DESVEST</b>	0,143
	<b>C.V</b>	8,9%
	<b>r</b>	<b>24,8%</b>

Nº Muestra	NMP/g	Log
11b	35	1,544
12b	64	1,806
13b	20	1,301
14b	39	1,591
15b	43	1,633
16b	35	1,544
17b	39	1,591
18b	64	1,806
19b	39	1,591
20b	35	1,544
	<b>MEDIA</b>	1,595
	<b>DESVEST</b>	0,143
	<b>C.V</b>	9%
	<b>r</b>	<b>25,2%</b>

## ANEXO 8

Resultados Método Cuantitativo Matriz Chorito. Segundo Nivel de Contaminación: Primer Analista (Muestras 11 a 20). Segundo Analista (Muestra 11b a 20b).

Nº Muestra	NMP/g	Log
11	210	2,322
12	290	2,462
13	290	2,462
14	210	2,322
15	640	2,806
16	150	2,176
17	390	2,591
18	290	2,462
19	350	2,544
20	270	2,431
	<b>MEDIA</b>	2,458
	<b>DESVEST</b>	0,171
	<b>C.V</b>	7%
	<b>r</b>	19,5%

Nº Muestra	NMP/g	Log
11b	390	2,591
12b	210	2,322
13b	290	2,462
14b	240	2,380
15b	750	2,875
16b	290	2,462
17b	430	2,633
18b	750	2,875
19b	340	2,531
20b	750	2,875
	<b>MEDIA</b>	2,601
	<b>DESVEST</b>	0,210
	<b>C.V</b>	8,1%
	<b>r</b>	22,6%

## ANEXO 9

Resultados Método Cuantitativo Matriz Chorito. Tercer Nivel de Contaminación: Primer Analista (Muestras 11 a 20). Segundo Analista (Muestra 11b a 20b).

Nº Muestra	NMP/g	Log
11	4600	3,663
12	1600	3,204
13	1200	3,079
14	2400	3,380
15	2100	3,322
16	1200	3,079
17	1500	3,176
18	2100	3,322
19	2400	3,380
20	4600	3,663
	<b>MEDIA</b>	3,327
	<b>DESVEST</b>	0,209
	<b>C.V</b>	6,3%
	<b>r</b>	17,6%

Nº Muestra	NMP/g	Log
11b	4600	3,663
12b	1600	3,204
13b	1500	3,176
14b	2900	3,462
15b	2400	3,380
16b	1600	3,204
17b	1500	3,176
18b	2100	3,322
19b	2900	3,462
20b	4600	3,663
	<b>MEDIA</b>	3,371
	<b>DESVEST</b>	0,189
	<b>C.V</b>	5,6%
	<b>r</b>	15,7%

## ANEXO 10

Tabla Número Más Probable del Método FDA-BAM para *V. parahaemolyticus*.

Table 1 For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.											
Pos. Tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes				Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001	MPN/g	Low	High
0	0	0	<3.0	-	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	-