

# **UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”**

Escuela de Post Grado



Maestría en Ciencias

## **INGENIERÍA AMBIENTAL**

### **“DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA DE ORIGEN MICROBIANO EN LECHE CRUDA Y SU RELACIÓN CON NMP DE COLIFORMES”**

Tesis presentada para optar el Grado Académico de Máster en Ciencias con  
mención en Ingeniería Ambiental

Autor:

**RUBÉN EDUARDO ASALDE RAMOS**

LAMBAYEQUE – PERÚ

Abril – 2017

# “DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA DE ORIGEN MICROBIANO EN LECHE CRUDA Y SU RELACIÓN CON NMP DE COLIFORMES”

.....  
Rubén E. Asalde Ramos, Br.  
Autor

.....  
José Reupo Periche, MSc.  
Asesor

Presentado a la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo para optar el grado de MAESTRO EN CIENCIAS, CON MENCIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL.

APROBADO POR:

.....  
**Dra. Graciela Albino Cornejo**  
Presidente de Jurado

.....  
**Dr. Néstor Rodríguez Alayo**  
Secretario de Jurado

.....  
**Dr. Jhon García López**  
Vocal de Jurado

Abril, 2017

## CONTENIDO

	Página
Lista de tablas y figuras .....	5
Resumen .....	7
Abstract .....	8
I. INTRODUCCIÓN .....	9
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS .....	11
III. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1. Material:	
3.1.1. Biológico .....	14
3.1.2. De Vidrio .....	14
3.1.3. De polipropileno .....	14
3.1.4. Medios de Cultivo .....	14
3.1.5. Reactivos .....	14
3.1.6. Equipos e instrumentos .....	14
3.1.7. Otros .....	15
3.2. Metodología:	
3.2.1. Propuesta de detección de actividad de fosfatasa alcalina de origen microbiano basada en el funcionamiento de un biosensor óptico .....	15
3.2.2. Recuento de coliformes .....	16
3.2.3. Detección de actividad de fosfatasa alcalina de <i>Escherichia coli K-12</i> .....	19
3.2.4. Recuento de <i>E. coli K-12</i> productoras de fosfatasa alcalina .....	20
3.2.5. Detección de actividad de fosfatasa alcalina en leche cruda .....	22
3.2.6. Validación interna de la prueba que estima el número de bacterias productoras de fosfatasa alcalina en muestras de leche .....	23
4. RESULTADOS:	
4.1. Recuento de coliformes .....	25
4.2. Recuento de <i>Escherichia coli K-12</i> y detección de actividad de fosfatasa alcalina .....	25
4.3. Validación interna de la prueba:	
4.3.1. Selectividad .....	29
4.3.2. Linealidad .....	30
4.3.3. Precisión .....	33
4.3.4. Exactitud .....	34

4.3.5. Límite de detección y límite de cuantificación.....	35
5. DISCUSIÓN .....	37
6. CONCLUSIONES .....	42
7. RECOMENDACIONES .....	43
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
9. ANEXOS:	
9.1. Tabla NMP .....	49
9.2. Fotografías de los ensayos .....	50

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

### **Lista de Tablas:**

- Tabla 1: Recuento de coliformes/ml en muestras de leche cruda con la técnica del NMP (Basado en la norma ISO 7251).
- Tabla 2. Diluciones de cultivo de 18 horas de *E. coli* k-12 y absorbancias obtenidas a 550nm.
- Tabla 3. Correspondencia entre la cantidad de *E. coli* k-12 y la actividad de fosfatasa alcalina de las diluciones de cultivo bacteriano.
- Tabla 4. Ejemplos de estimación del número de bacterias/ml mediante detección de actividad de fosfatasa alcalina, según el modelo logarítmico  $y = 98,229 \ln - 1.229,4$ .
- Tabla 5. Actividad de fosfatasa alcalina en una muestra de leche cruda para la validación por selectividad.
- Tabla 6. Actividad de fosfatasa alcalina en diferentes niveles de concentración de una muestra de leche cruda para la validación por linealidad.
- Tabla 7. Actividad de fosfatasa alcalina en una muestra de leche cruda para la validación por precisión.
- Tabla 8. Cuantificación de bacterias mediante detección de actividad de fosfatasa alcalina y NMP (ISO 7251) en muestras de leche cruda para validación de exactitud.
- Tabla 9. Actividad de fosfatasa alcalina en dos niveles de concentración de una muestra de leche cruda para validación de límite de detección y cuantificación.

### **Lista de Figuras:**

- Figura 1. Detección de fosfatasa alcalina acondicionado a un modelo de biosensor.
- Figura 2. Método horizontal para el recuento de *Escherichia coli* presuntivas. Técnica del NMP (Basado en la norma ISO 7251).
- Figura 3. Método horizontal para el recuento de Coliformes. Técnica del recuento de colonias (Basado en la norma ISO 4832).
- Figura 4. Línea de tendencia de actividad de fosfatasa alcalina (UI/L) en función del número de bacterias por mililitro.
- Figura 5. Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes. Se observan las frecuencias de los tratamientos de la leche cruda para validación de la selectividad.
- Figura 6. Recta de regresión lineal de detección de actividad de fosfatasa alcalina de origen microbiano en leche cruda.
- Figura 7. Comparación de las varianzas de las distintas concentraciones de leche cruda y su actividad de fosfatasa alcalina, analizadas en la prueba de linealidad.

## RESUMEN

Con la finalidad de detectar la actividad de fosfatasa alcalina y relacionarla con el número más probable (NMP) de bacterias coliformes por mililitro, se analizaron muestras de leche cruda entera obtenidas de un programa de asistencia alimentaria del distrito de Chiclayo.

El número más probable de bacterias coliformes de las muestras de leche cruda entera, fue estimado con el procedimiento ISO 7251, 2005 (NMP en tubo). Para la detección de actividad de fosfatasa alcalina (FA), se empleó 200 µl de una muestra de leche homogenizada con 800 µl de SDS 0,1%. Esta solución se pasó por un filtro de membrana de 0,22 µm de porosidad. Se descartó el filtrado. Las bacterias retenidas en el filtro fueron tratadas con buffer lisozima (50 µl: Tris-HCl 25mM, EDTA 10mM, Sucrosa 15%, pH 8,0 y lisozima 35 mg/ml). El filtrado resultante, que contiene FA, se enfrentó con una solución de fenil fosfato de sodio (sustrato), 4-aminoantipirina 29 mmol/l en aminometil propanol 3 mol/l a pH 10 (buffer) y ferrocianuro de potasio 10 mmol/l (agente oxidante). El tiempo de reacción fue 10 minutos a 37°C. El resultado se comparó con un patrón de fenol equivalente a 200 UI/l de FA.

Para estimar la actividad de FA por bacteria, se utilizó *Escherichia coli* K-12 productora de la enzima. Se preparó un cultivo de 18 horas en caldo peptonado a partir del cual se hizo diluciones hasta 1: 512. Una muestra de cada dilución (950 µl) fue tratada con buffer lisozima (50 µl); luego, se determinó la actividad de FA de manera similar como se hizo con las muestras de leche. El número de bacterias en el cultivo de 18 horas fue contado con el procedimiento ISO 4832, 2006 (NMP en placa).

Para relacionar el NMP de coliformes/ml con la actividad de FA en una muestra de leche, se tuvo en cuenta una ecuación logarítmica derivada de la actividad de la enzima. Este procedimiento fue sometido a validación interna siguiendo las recomendaciones de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Oficina de Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos. Respecto a la validación de la selectividad de la prueba, se encontró 84,78% de interferencia. La prueba mostró linealidad; el coeficiente de correlación resultó 0,99 y el de determinación 99,8%. El coeficiente de variación fue 11,38%. El límite de detección resultó 0,093 UI/l de actividad de fosfatasa alcalina y el de cuantificación 0,309 UI/l. Se recomienda realizar ensayos de esta prueba en diferentes cepas productoras de la enzima.

**Palabras Clave:** Fosfatasa alcalina, NMP de coliformes, Contaminación de leche.

## ABSTRACT

In order to detect alkaline phosphatase activity and relate it to the most probable number (MPN) of coliform bacteria per milliliter samples of whole raw milk obtained from a food assistance program in the district of Chiclayo, was analyzed.

The most probable number of coliform bacteria of samples of whole raw milk, was estimated with ISO 7251, 2005 (MPN tube) procedure. For the detection of AP activity, 200  $\mu$ l homogenized milk with 800  $\mu$ l 0.1% SDS was used. This solution was passed through a membrane filter 0,22  $\mu$ m porosity. The filtrate was discarded. Bacteria retained on the filter were treated with lysozyme buffer (50  $\mu$ l: 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 15% Sucrose, pH 8,0 and lysozyme 35 mg/ml). The resulting filtrate containing AP, was mixed with a solution of phenyl sodium phosphate (substrate), 4-aminoantipyrine 29 mmol/l in aminomethyl propanol 3 mol/l pH10 (buffer) and potassium ferrocyanide 10 mmol/l (oxidizing agent). The reaction time was 10 minutes, at 37 °C. The result was compared with a standard phenol equivalent 200 IU/l of AP.

Was used *Escherichia coli* K-12 enzyme producing to estimate AP activity by bacteria. 18-hour culture was prepared in peptone broth from which dilutions were made up to 1: 512. A sample of each dilution (950  $\mu$ l) was treated with lysozyme buffer (50  $\mu$ l); then AP activity was determined in a similar manner as was done with the milk sample. The number of bacteria in the culture of 18 hours was counted with the ISO 4832, 2006 (plaque MPN) procedure.

To relate the MPN coliform / ml with AP activity in a sample of milk was considered a logarithmic equation derived from the activity of the enzyme. This procedure was subjected to internal evaluation following the recommendations of the Spanish Association of Pharmaceutical Industry (AEFI), the Food and Agriculture Organization of the United Nations and Food and Drug Administration (FDA) of the United States. For the validation of the selectivity of the test, 84,78% interference was found. The test showed linearity. The correlation coefficient was 0,99; the determination coefficient 99,8%. The variation coefficient was 11,38%. The detection limit was 0,093 IU/l of alkaline phosphatase activity and the quantization 0,309 IU/l. It is recommended that this test trials in different strains producing the enzyme.

**Keys words:** Alkaline phosphatase, MPN coliform, milk pollution

## I. INTRODUCCIÓN.

La contaminación de alimentos consiste en la presencia de sustancias de origen biológico o químico, que son riesgosas o tóxicas para la salud del consumidor<sup>1</sup>. Los programas de vigilancia, prevención y control de la contaminación de alimentos en Perú, se actualizaron con el D.S. 007-98-SA, 24.SEP.98 (Reglamento sobre el Control Sanitario de Alimentos y Bebidas), y hace algunos años se han acondicionado a las normas internacionales (R.M. N° 591-2008-MINSA)<sup>2,3</sup>, esto supone la implementación de técnicas microbiológicas que permitan la detección de microorganismos de manera rápida y eficaz. Actualmente, las técnicas utilizadas en nuestro país implican tres días de procesamiento de muestras para obtener resultados.

El principal efecto nocivo a la salud, producto de una contaminación alimentaria, es un episodio de enfermedad diarreica aguda (EDA), el cual es de notificación obligatoria a la Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud<sup>4</sup>.

Las enfermedades diarreicas agudas (EDA), constituyen un problema de salud pública en el país. El impacto producido por estas enfermedades, especialmente en niños y ancianos, se ha caracterizado por su efecto negativo sobre el estado nutricional y elevadas tasas de mortalidad infantil (760 mil muertes en niños menores de 5 años, según OMS). Los episodios de EDA muestran una tendencia lenta de descenso, con mayores episodios en las primeras semanas del año, debido a que el clima favorece la diseminación de las bacterias que las provocan. La Encuesta Demográfica y de Salud Familiar (ENDES 2014), muestra que la prevalencia de diarrea entre niños menores de cinco años de edad alcanzó 12,1%, un porcentaje menor al encontrado en la Encuesta 2009 (14,0%)<sup>5</sup>.

Las bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos son principalmente: *Vibrio sp*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Escherichia coli*, *Campylobacter sp*, *Yersinia sp*, *Clostridium sp*, *Staphylococcus sp* y desde hace algunos años se investiga con énfasis *Listeria monocytogenes*. De ellas, el principal indicador de contaminación alimentaria es *Escherichia coli*, la cual se ha investigado tradicionalmente con la técnica del número más probable (NMP)<sup>6</sup>. Actualmente, se dispone de kits de detección basados en RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), los cuales han reducido el tiempo de detección a un día<sup>7</sup>.

Muchas de las organizaciones gubernamentales que tienen bajo su responsabilidad la vigilancia y el control de la contaminación de los alimentos, a pesar de haber implementado algunos programas de

educación sanitaria, no presupuestan recursos para investigar o adquirir kits de detección de bacterias indicadoras de contaminación o sus metabolitos<sup>7,8</sup>, de manera que se hace más difícil reducir la tasa de morbilidad de la población, afectada específicamente en el tracto gastrointestinal.

Algunas investigaciones orientadas a la evaluación de la calidad sanitaria de leche cruda, han sugerido reformas en la detección de patógenos debido a su bajo nivel de identificación. Especial referencia se ha hecho a las metodologías de cultivo microbiano ISO, por lo que se requiere un nuevo enfoque en la trazabilidad de este alimento<sup>9</sup>.

El uso de la tecnología de biosensores conocida internacionalmente desde 1962 y aplicada a la medicina en 1975<sup>10</sup>, podría resultar una alternativa de solución. Actualmente, estos instrumentos están al servicio del control de la contaminación ambiental, la industria agroalimentaria, la farmacéutica, los procesos industriales, entre otros. El desarrollo de investigaciones básicas y aplicadas en esta línea está aún incipiente en nuestro país. Por lo tanto, es un reto iniciar la búsqueda de soluciones rápidas y económicas, sobre todo para los programas de asistencia alimentaria donde se ha reportado contaminación microbiana<sup>11</sup>.

En este contexto se planteó la posibilidad de cuantificar bacterias a través de la detección de la actividad de fosfatasa alcalina, relacionándola con la técnica del número más probable de coliformes. Para ello, se analizó la tecnología de un biosensor óptico y se probó una forma de detección de la actividad enzimática, validando esta técnica según lo sugerido por la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Oficina de Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.

## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

La detección de fosfatasa alcalina ha sido tradicionalmente utilizada como marcador de pasteurización de leche, debido a su termolabilidad<sup>12, 13</sup>. Y aunque se le ha relacionado con la presencia de microorganismos patógenos, en la región no se ha encontrado trabajos de investigación que propongan la cuantificación de bacterias a partir de la evaluación de la actividad esta enzima; sobre todo relacionándola con la técnica del número más probable de coliformes.

Por otro lado, las investigaciones sobre biosensores, que datan desde 1962, cuando Clark y Lyons desarrollaron un analizador de glucosa, comercializado en 1975 como “Enzyme electrode” por Yellow Springs Instrument Company; han sido el punto de partida para desarrollar métodos rápidos, confiables y económicos, que faciliten el hallazgo de analitos de interés médico o alimentario, como el caso de fosfatasa alcalina<sup>14</sup>.

Se ha descrito que el control de calidad, utilizando Análisis de Peligros y Puntos Críticos Control en la industria láctea, genera un gran volumen de muestras y los costos asociados son significativos. Por lo tanto, urge el desarrollo y aplicación de sistemas analíticos rápidos, sensibles y rentables para la detección de patógenos en la leche. Como es de esperarse, se ayudaría a la industria láctea en la reducción de los gastos generales y la gestión de la producción. Los recientes avances en las tecnologías de detección de patógenos para el análisis de la leche, se ha centrado en la amplificación del ácido nucleico y biosensores<sup>15</sup>.

Es de especial interés centrarse en tecnologías rápidas y económicas, por lo que la forma inteligente de detectar microorganismos útiles o perjudiciales, es hacerlo mediante el uso de biosensores, lo cual constituye un desafío para los investigadores<sup>16</sup>. Desde hace varias décadas se ha propuesto esta tecnología para industrias de alimentos y bebidas, ya que estas usan métodos analíticos laboriosos, que demandan uno a más días. Con una tecnología moderna se podrá asegurar la calidad de los productos y el control de procesos<sup>17</sup>.

Se ha encontrado investigaciones bibliográficas que han tomado varios años de revisión y que resaltan la importancia de los biosensores y su aplicación en la investigación en alimentos y homólogos; sobre todo en el control de procesos automatizados y no automatizados, detección de micotoxinas, identificación de factores antinutricionales, residualidad de contaminantes orgánicos tradicionales y emergentes (pesticidas, antibióticos, hormonas, dioxinas, furanonas, entre otros), seguimiento y

control microbiológico, presencia de organismos genéticamente modificados, alérgenos y composición nutricional, entre otros. Y se ha visto que esta tecnología es una excelente alternativa a los métodos convencionales que, para detectar una contaminación microbiana, dependen de etapas de enriquecimiento, seguidos de una identificación bioquímica, tomando en algunos casos hasta una semana para toda la prueba.<sup>18-20</sup>

Muchos trabajos de investigación reportan identificación de patógenos de alimentos y agua, especialmente *Escherichia coli*, utilizando técnica de biosensores, unos amperométricos otros potenciométricos o piezoeléctricos<sup>21-23</sup>. Sin embargo, no se ha encontrado reportes sobre el uso de fosfatasa alcalina como analito, sino como transductor de bioafinidad, como el utilizado por Liu & Li<sup>24</sup>, para detectar *Escherichia coli* O157:H7. En su trabajo, ellos separaron inmunomagnéticamente al patógeno de la muestra a manera de sándwich (anticuerpos en camas micromagnéticas - *E. coli* - anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina) y luego midieron la absorbancia del *p*-nitrofenol a 400 nm, a partir de la hidrólisis del *p*-nitrofenil por la fosfatasa alcalina (E.C.3.1.3.1). Se examinó la selectividad del sistema y no se observó interferencia de otros patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes*. El rango de detección fue  $3,2 \times 10^2$  a  $3,2 \times 10^4$  UFC/mL y la desviación estándar relativa fue 2,5 – 9,9%. La detección total se realizó en menos de 2 horas.

En la búsqueda de información sobre posibilidad del conteo microbiano basado en el funcionamiento de un biosensor óptico, se encontró referencias de sensores ópticos diseñados a identificar secuencias de ADN de *E. coli*, como el desarrollado por Almadidy et al<sup>25</sup>, quienes utilizaron sondas del gen Lac Z sobre una superficie de fibra óptica, con agentes fluorescentes intercalares, para reportar eventos de hibridación en las cadenas diana. Este biosensor fue capaz de detectar secuencias de ADN en *E. coli* a nivel de picomoles en pocos minutos.

También se ha informado acerca de biosensores que cuantifican células somáticas o bacterias<sup>26</sup>, específicamente *E. coli*; no solo en muestras de carne<sup>27</sup> o espinacas<sup>27, 28</sup>, sino también en leche cruda<sup>26, 29</sup>.

En el caso de conteo de células, Maraldo y Mutharasan<sup>27</sup>, por ejemplo, mediante sensores PEMC (Piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever), lograron cuantificar *Escherichia coli* O157:H7 (EC) en muestras de carne molida. El cambio total de la frecuencia de resonancia obtenido para las muestras inoculadas fue  $138 \pm 9$ ,  $735 \pm 23$ ,  $2.603 \pm 51$  y

7.184 ± 606 Hz, correspondientes a concentraciones de EC de 10, 100, 1.000 y 10.000 células/ml, respectivamente.

Como se ha referido, la actividad de fosfatasa alcalina no se ha asociado al conteo de bacterias contaminantes de la leche, pero si al conteo de bacterias mesófilas en espinaca. En este procedimiento se utilizó un kit de detección basado en emisión de fluorescencia y se estableció una ecuación de regresión entre la actividad de la enzima y el número de células ( $r=0,9$ )<sup>28</sup>.

Por otro lado, la enzima que más se ha investigado y relacionado con el conteo de bacterias coliformes ha sido beta galactosidasa. Unas investigaciones, como la de Boyachi<sup>30</sup>, han utilizado inmunosensores basados en la captura de *E. coli*, cultivándola en caldo Luria Bertani con la adición del inductor isopropil beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG). En este caso, la beta galactosidasa inducida convirtió p-aminofenil beta D-galactopiranosido (PAPG) en p-aminofenol (PAP), el cual fue medido por amperometría usando un electrodo de disco rotatorio de oro. Se obtuvo una buena correlación lineal ( $r^2= 0,989$ ) entre el log UFC/ml de *E. coli* y el tiempo necesario para producir una concentración específica de PAP. La detección amperométrica permitió la detección de  $2 \times 10^6$  UFC/ml de *E. coli* dentro de los 30 minutos del período de incubación. Otro caso parecido fue el desarrollado por Mittelmann et al<sup>31</sup>, quienes usaron p-amino fenil beta D-galactopiranosido como sustrato, determinando la densidad de coliformes representado por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. La detección de *E. coli* fue lograda usando un electrodo cubierto por anticuerpos que se unen específicamente a la bacteria. La detección amperométrica permitió la determinación de  $10^3$  UFC/ml en 60-75 min.

Hasta ahora, en el campo del diagnóstico rápido, fosfatasa alcalina se ha reportado más comúnmente como parte del elemento transductor de un sensor de detección rápida de un determinado analito, que en algunos casos ha sido un microorganismo<sup>27</sup>.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 3.1. *Material.*

##### 3.1.1. **Biológico.**

- Leche cruda entera recolectada del Programa “Vaso de Leche” del distrito de Chiclayo.
- *Escherichia coli* K-12 (BioRad)

##### 3.1.2. **De Vidrio.**

- Tubos de ensayo 15 x 100 (Pirex)
- Tubos de Durham (Kimax)
- Matraces de 500 ml (Kimax)
- Pipetas de 10 ml (Kimax)

##### 3.1.3. **De polipropileno.**

- Tubos de centrífuga 2 ml (Eppendorf)
- Cubetas para espectrofotómetro (Brand)
- Tips para micropipetas de 2-100 µl y 100-1000 µl (Brand)

##### 3.1.4. **Medios de Cultivo.**

- Caldo Lauril sulfato (Merck)
- Caldo lactosado bilis 2% (Merck)
- Caldo Peptonado (Merck)

##### 3.1.5. **Reactivos.**

- Dodecil sulfato de sodio 0,1% (SIGMA)
- Buffer: 4-aminoantipirina 29 mmol/l en solución de aminometil propanol 3 mol/l, pH 10 (a 37°C) (Wiener)
- Fenilfosfato de sodio 1,4 mol/100ml (Wiener)
- Ferrocianuro de potasio 10 mmol/l (Wiener)
- Solución de fenol equivalente a 200 UI/l de fosfatasa alcalina (Wiener)
- Lisozima 35 mg/ml (Lisolac® - REFASA)
- Agua destilada

##### 3.1.6. **Equipos e instrumentos**

- Espectrofotómetro UV-VIS Genesys 10 (Thermo)
- Baño de agua 37°C (Branstead/Lab-Line)
- Incubadora 30°C (Mettler)
- Micropipeta 10 – 100 µl (HTL)
- Micropipeta 100 – 1000 µl (HTL)

- Cronómetro (Sunbeam)

### **3.1.7. Otros.**

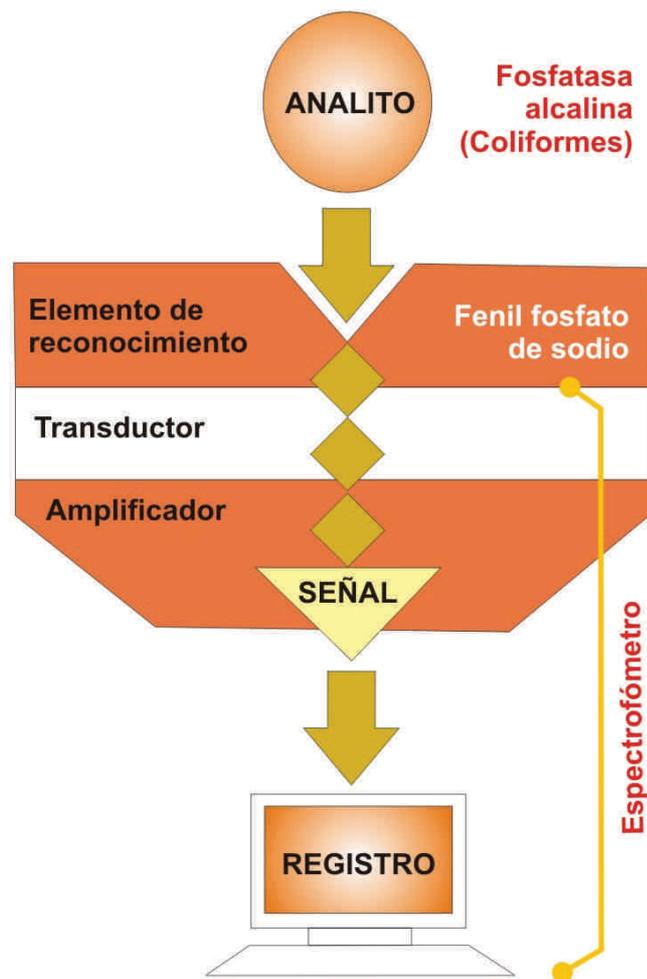
- Filtros de membrana estériles de 0,22  $\mu\text{m}$  de porosidad (Sterile Millex® Filter Unit - Millipore)
- Tips para micropipeta de 10-100 $\mu\text{l}$  y de 100-1000 $\mu\text{l}$  (HTL)
- Jeringas hipodérmicas 1 ml (Nipro)
- Algodón (CKF)
- Gradillas, marcadores de tinta indeleble.

## **3.2. Metodología.**

### **3.2.1. Propuesta de detección de actividad de fosfatasa alcalina de origen microbiano basada en el funcionamiento de un biosensor óptico.**

Sobre la base del fundamento del funcionamiento de un biosensor óptico<sup>10</sup>, se planteó la forma de cuantificar bacterias con actividad de fosfatasa alcalina en leche cruda. (Figura 1):

- Se consideró un pretratamiento de cada muestra de leche cruda con Dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1% para liberar la enzima de fuentes no microbianas, como la que permanece capturada en glóbulos de grasa<sup>32</sup>.
- Para el atrapamiento de bacterias productoras de la enzima, se usó un filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{l}$  de porosidad.
- El elemento de reconocimiento estuvo representado por fenil fosfato de sodio; con buffer aminoantipirina en aminometil propanol a pH 10, como medio de interacción. Y el sistema de transducción, emisión de señal y registro de datos, estuvo representado por el espectrofotómetro UV-VIS Genesys 10 (Thermo).



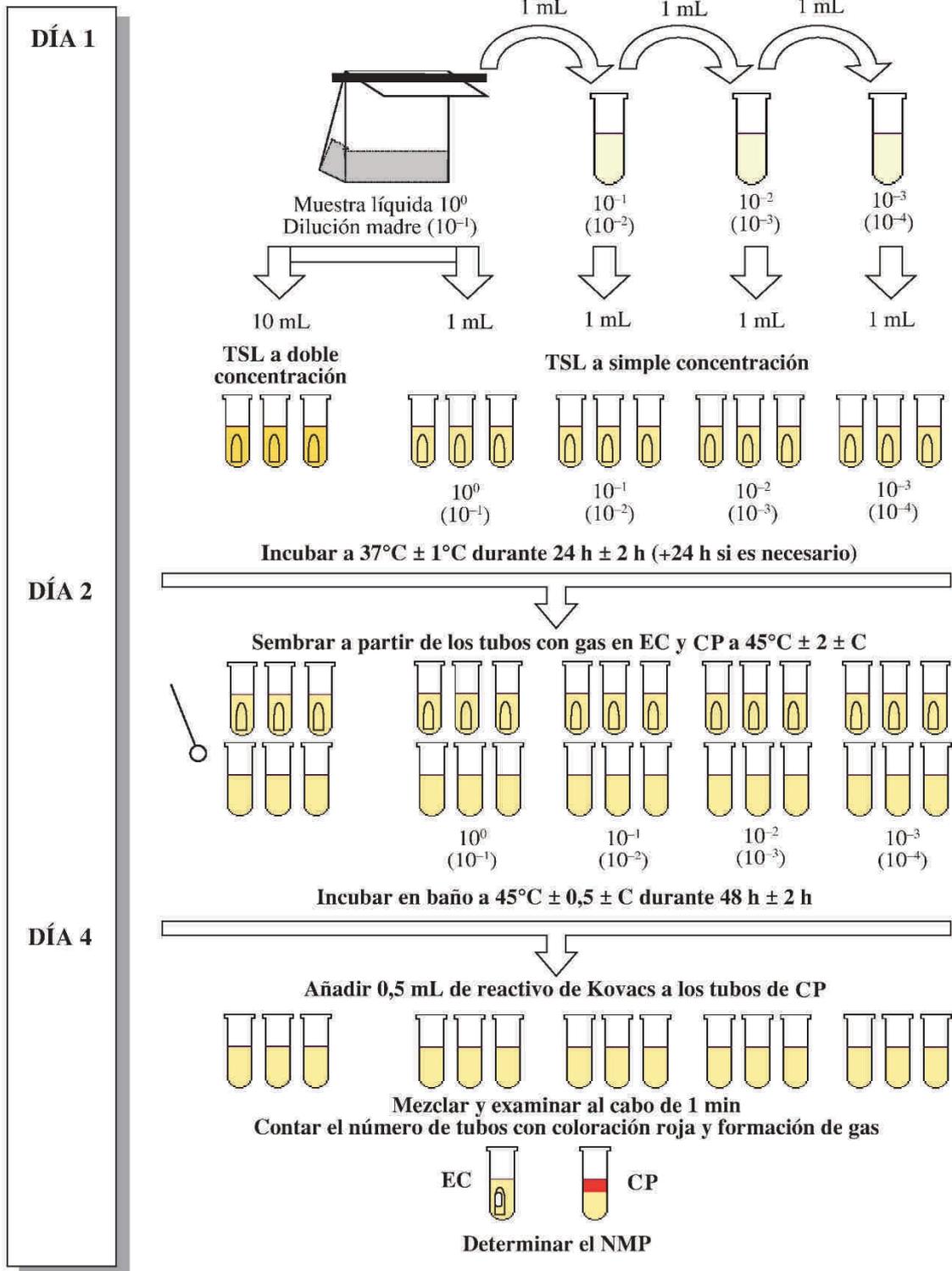
**Figura 1.** Detección de actividad de fosfatasa alcalina de origen microbiano acondicionado a un modelo de biosensor.

### 3.2.2. Recuento de Coliformes (Basado en ISO 7251; 2005)<sup>33</sup>.

El NMP de coliformes, es la prueba estándar para detectar la contaminación de leche. Por lo tanto, para conocer la cantidad de coliformes presentes en una muestra de leche cruda, se usó esta técnica, basada en el procedimiento ISO 7251, 2005; y se procedió de la siguiente manera (Figura 2):

- Se preparó series de tres tubos con caldo triptona lauril sulfato (TSL) conteniendo campanas de Durham. Del mismo modo, se preparó tubos con caldo *Escherichia coli* (EC).
- En tubos con 9 ml de caldo peptonado 0,1% (CP), se realizó diluciones de la muestra de leche cruda entera.

- Se sembró 1 ml de cada dilución en cada una de las series de tubos con caldo triptona lauril sulfato.
- Luego se incubó a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas (+ 24 horas si era necesario).
- A partir de cada tubo en donde se formó gas, se sembró con asa de kolle en caldo EC y en caldo peptonado 1%.
- Se incubó a  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  durante  $48 \pm 2$  horas.
- La prueba se consideró positiva si producía desprendimiento de gas en caldo EC e indol en CP (comprobado por la adición de reactivo de Kovac's y formación de un anillo rojo).
- Para el conteo, se consideró 3 diluciones con tubos positivos según los siguientes casos:
  - ✓ Cuando al menos una dilución presentaba 3 tubos positivos, se eligió la más diluida que presente los 3 tubos positivos y las dos diluciones siguientes con tubos positivos.
  - ✓ De no presentarse el caso anterior, se eligió las últimas 3 diluciones (más diluidas) que contenían al menos un tubo positivo.
- El NMP fue determinado con la ayuda de la tabla preparada para este caso. (Anexo 1).



**Figura 2.** Método horizontal para el recuento de *Escherichia coli* presuntivas. Técnica del NMP (Basado en la norma ISO 7251).

### 3.2.3. Detección de actividad de fosfatasa alcalina de *Escherichia coli k-12*.

Debido a que *E. coli* es la bacteria representativa de las coliformes y con la finalidad de tener un patrón bacteriano de actividad de fosfatasa alcalina se utilizó una cepa de *E. coli K-12*, para lo cual se hizo lo siguiente:

- Se preparó un cultivo de *Escherichia coli K-12*, de 18 horas, en caldo peptonado 1%.
- Luego, se realizó diluciones al medio en caldo peptonado 1% hasta 1:512.
- Después de homogeneizar, se leyeron las absorbancias de cada dilución a 550 nm.
- Además, 950 µL de cada dilución se mezcló y homogeneizó con 50 µL de buffer lisozima (Tris-HCl 25mM, EDTA 10mM, Sucrosa 15%, pH 8,0 y lisozima 35 mg/mL). Se dejó reposar durante 10 minutos.
- A partir de este lisado, se tomó una muestra de 25 µl para determinar la actividad de fosfatasa alcalina.
- Para lograrlo, con cada dilución se trabajó de la siguiente manera:
  - ✓ Se incubó durante 5 minutos en baño de agua a 37°C, tres tubos de ensayo marcados como B, S y M; y que contenían 250 µl de un buffer formado por 4-aminoantipirina (29 mmol/l) en solución de aminometil propanol (3 mol/l) más fenil fosfato de sodio (14 mM), a pH 10.
  - ✓ Al tubo M se le agregó 25 µl de lisado; al tubo S, 25 µl de una solución de fenol equivalente a una actividad de FA de 200 UI/l. El tubo B se mantuvo solo con el buffer.
  - ✓ Después de 10 minutos de incubación, se agregó a todos los tubos 1.250 µl de ferrocianuro de potasio (10 mmol/l).
  - ✓ Luego se leyó la absorbancia de la reacción coloreada de los tubos en un espectrofotómetro a 520 nm de longitud de onda, llevando el equipo a cero con la solución buffer contenida en el tubo B.
  - ✓ Finalmente se realizó el cálculo de actividad de fosfatasa alcalina con la fórmula:

$$\text{Fosfatasa Alcalina (UI/l)} = \frac{200}{Abs S} \times Abs M$$

### 3.2.4. Recuento de *E. coli* k-12 productoras de fosfatasa alcalina (Basado en ISO 4832; 2006)<sup>33</sup>.

Para conocer el número de *E. coli* k-12 que contenía el cultivo de 18 horas, se realizó el procedimiento ISO 4832; 2006, que a continuación se describe (Figura 3):

- Se realizó diluciones al décimo del cultivo microbiano de 18 horas.
- Se agregó por duplicado, 1 ml de cada una de las diluciones en placas Petri estériles.
- Se añadió 15 ml de agar Mc Conkey a  $45 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- Después de homogeneizar se dejó solidificar. Aparte, se preparó una placa testigo para controlar la esterilidad del medio.
- Luego, se incubó cada cultivo a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Para el conteo, se consideró las colonias características (diámetro mayor o igual a 0,5 mm) en las placas que contenían menos de 150 colonias.
- Se tomó en cuenta las placas que contenían un máximo de 150 colonias al nivel de dos soluciones sucesivas. Era necesario que al menos una placa contenga más de 15 colonias.
- Se calculó el número de bacterias por mililitro según la fórmula:

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

Donde:

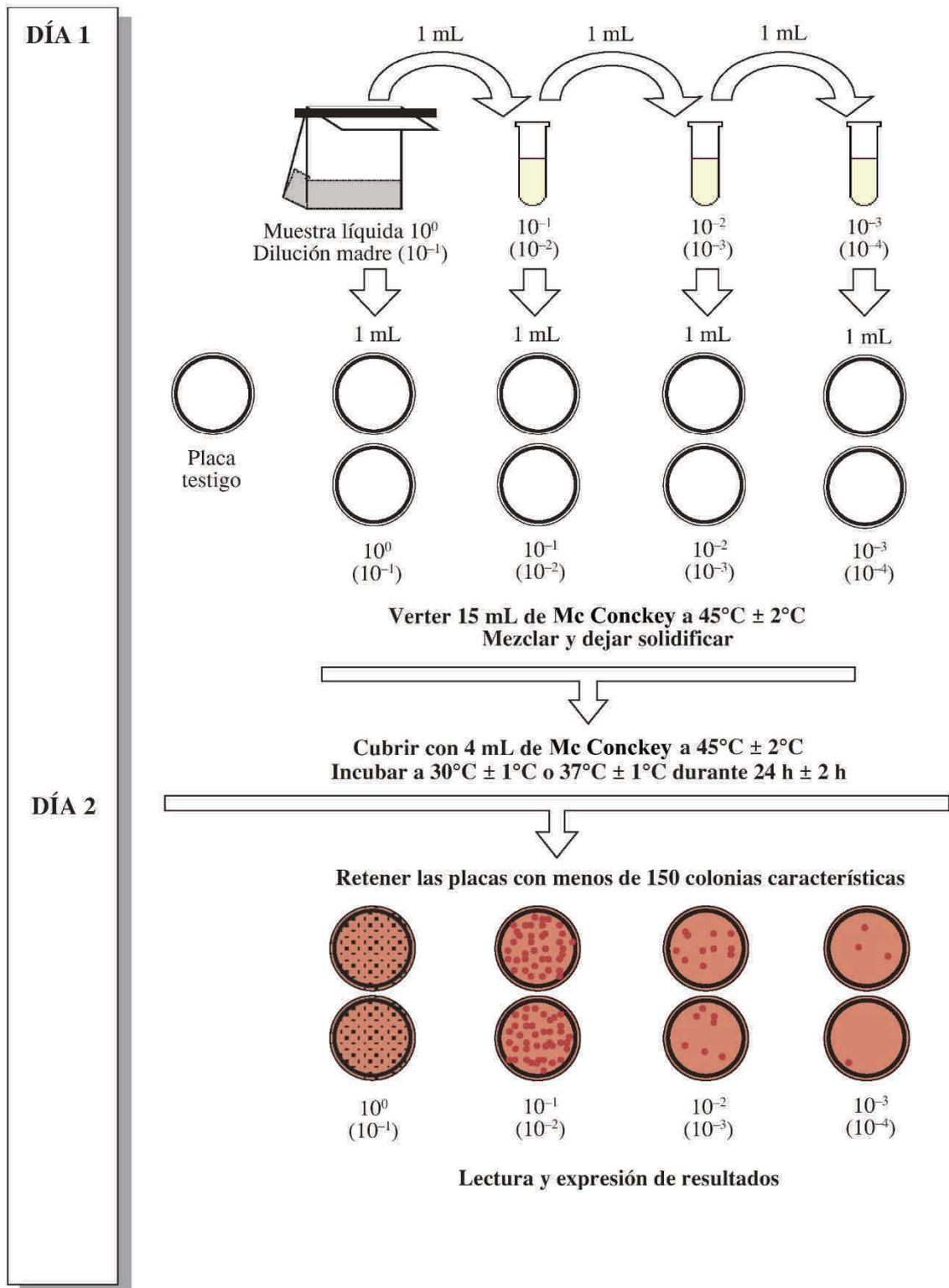
$\sum C$  = Suma de las colonias contadas en todas las placas consideradas, de dos diluciones sucesivas y con al menos una placa con un mínimo de 15 colonias.

$n_1$  = número de placas consideradas en la primera dilución.

$n_2$  = número de placas consideradas en la segunda dilución.

$d$  = nivel de dilución correspondiente a la primera dilución considerada para el contero ( $d = 1$  cuando la muestra para análisis se ha sembrado directamente).

Conociendo el número de bacterias encontradas en el cultivo de 18 horas, se pudo deducir qué valor de fosfatasa alcalina corresponde a este determinado número de células.



**Figura 3.** Método horizontal para el recuento de *Escherichia coli* K-12. Técnica del recuento de colonias (Basado en la norma ISO 4832).

### 3.2.5. Detección de actividad de fosfatasa alcalina de origen microbiano en leche cruda.

Con la finalidad de conocer si existe relación entre la actividad de fosfatasa alcalina de origen microbiano en leche cruda y el NMP de coliformes, se procedió de la siguiente manera:

- En un tubo de ensayo 15x100 se agregó 200 µl de leche cruda entera más 800 µl de SDS 0,1%.
- Después de mezclar e incubar a 37°C por diez minutos, se filtró la solución a través de una membrana estéril de 0,22 µm de poro.
- Se lavó el filtro con 500 µl de agua destilada estéril y se descartó el lavado.
- Se añadió al filtro 30 µl de lisozima 35 mg/ml y dejó diez minutos a temperatura ambiente (22°C). Este procedimiento lisó la pared celular y dejó libre la fosfatasa alcalina del espacio periplasmático<sup>34</sup>.
- Se añadió 220 µL de agua destilada estéril y midió la actividad de fosfatasa alcalina del filtrado, como se hizo en el procedimiento 3.2.3, tomando como muestra 25 µl de este lisado mezclado con agua destilada.
- El valor final corresponde a la actividad enzimática bacteriana de 200 µl de leche, por lo que se multiplicó por 5 para tener el valor correspondiente a 1ml de leche.
- Teniendo en cuenta que, con los procedimientos anteriores, se puede estimar el número de bacterias en función de la actividad de fosfatasa alcalina, se aplicó la ecuación de regresión (siguiendo el modelo logarítmico)  $y = a + b \cdot \ln(x)$ :

$$x = e^{\left(\frac{y-a}{b}\right)}$$

Donde:

- $x$  = Número de bacterias esperado.
- $e$  = Constante, base de logaritmo natural.
- $y$  = Actividad de fosfatasa alcalina observada en función del número de bacterias según el modelo logarítmico.
- $a$  = Término constante de la regresión.
- $b$  = Razón de cambio esperada de actividad de fosfatasa *alcalina* (UI/L) por cada unidad de cambio en el logaritmo natural del número de bacterias ( $x$ ).

### **3.2.6. Validación interna de la prueba que estima el número de bacterias productoras de fosfatasa alcalina en muestras de leche cruda.**

Para la validación del test se tuvo en cuenta lo recomendado por la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Administración de medicamentos y alimentos de Estados Unidos (FDA) y Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO)<sup>35-37</sup>. En esta investigación se realizó pruebas de selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

#### **A. Selectividad.**

En esta prueba, se comparan los resultados del análisis de muestras con y sin el analito (fosfatasa alcalina). Para ello, se analizan dos grupos de muestras: uno de seis muestras sometido a tratamiento térmico en baño de agua a 100°C por cinco minutos y otro, sin tratamiento térmico.

Luego se aplica la prueba t de Student para comprobar la existencia o no de diferencias significativas entre los dos grupos. Si los datos obtenidos resultaran muy variados, se realiza una prueba no paramétrica para muestras independientes. Antes de aplicar la prueba, se debe comprobar la normalidad de la distribución muestral y la homogeneidad de variancias.

#### **B. Linealidad.**

Este test evalúa la capacidad del método para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Se analiza, por triplicado, cinco niveles de concentración del analito en una muestra de leche cruda entera (1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16). Con los resultados se prepara una tabla relacionando las cantidades o concentraciones “x” y la respuesta “y”. La relación entre ambas variables se expresa como una recta de regresión del tipo  $y = a + b \cdot x$ .

#### **C. Precisión.**

La precisión evalúa el grado de dispersión o concordancia entre una serie de medidas realizadas. Se realiza diez análisis de una misma muestra en las mismas condiciones de operación (analista, reactivos, equipos, tiempos). Los resultados se expresan con el

coeficiente de variación:  $CV (\%) = (\text{Desviación estándar}/\text{media aritmética de los resultados}) * 100$ .

#### **D. Exactitud.**

Para conocer la proximidad entre el valor de numeración de bacterias con actividad de fosfatasa alcalina en las muestras de leche, con el NMP de coliformes (tomando como biomarcador de contaminación de alimentos a *E. coli*), se analiza la actividad de fosfatasa alcalina de seis muestras de leche cruda y se determina en cada una de ellas, el NMP basado en la norma ISO 7251. Luego se realiza tratamiento estadístico de comparación de varianzas.

#### **E. Límite de detección y Límite de Cuantificación.**

Se prepara una serie de muestras con cantidades decrecientes del analito en la matriz (fosfatasa alcalina en leche cruda) y se analiza cada una de ellas, seis veces consecutivas.

De acuerdo con la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), el cálculo del límite de detección se realiza a partir de la desviación estándar de la muestra placebo (sin el analito) y la pendiente de la recta del analito<sup>35</sup>.

Como el método a ensayar es espectrofotométrico, método instrumental que corrige la señal frente a un blanco, el límite de detección teórico se calcula mediante la expresión:

$$CL = \frac{K * S_{bl}}{b \sqrt{n}}$$

Donde:

CL = concentración del analito en el límite de cuantificación (LC) o detección (LD).

K = constante que usualmente se considera 10 para LC y 3 para LD.

S<sub>bl</sub> = desviación estándar correspondiente a la señal del blanco

b = pendiente de la curva de calibrado obtenida al representar la respuesta del método frente a la concentración del analito.

n = Número de réplicas.

#### IV. RESULTADOS.

##### 4.1. Recuento de coliformes.

Para garantizar que la metodología de recuento propuesta sea lo más semejante posible con la técnica del NMP, las muestras de leche cruda se refrigeraron (un día) después de tomadas, hasta la realización del ensayo. Esto sirvió para validar internamente la exactitud de lo propuesto en esta investigación.

Se realizó diluciones hasta  $10^{-6}$  y el NMP se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Recuento de coliformes/ml en muestras de leche cruda con la técnica del NMP (Basado en la norma ISO 7251).

Muestra	Dilución más alta con tubos positivos	N° de tubos positivos	Recuento NMP* Coliformes/ml
1	$10^{-5}$	3	2.400
2	$10^{-5}$	3	2.400
3	$10^{-6}$	2	1.100
4	$10^{-6}$	1	480
5	$10^{-5}$	3	2.400
6	$10^{-5}$	3	2.400

\* Según tabla NMP (Anexo 1)

##### 4.2. Recuento de *Escherichia coli* k-12 y detección de actividad de fosfatasa alcalina.

Después de realizar el cultivo bacteriano en caldo peptonado 1% (18 horas), se preparó diluciones del hasta 1:512. Luego se midió las absorbancias a 550nm. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

El conteo de bacterias de este cultivo de 18 horas (método ISO 4832, 1991) resultó:

Dilución  $10^{-5}$  = Una placa con 133 colonias y otra con 181. Se consideró la que contenía 133.

Dilución  $10^{-6}$  = Una placa con 31 colonias y otra con 28.

Se tuvo en cuenta las placas que contenían entre 15 y 150 colonias.

El número de *E. coli* k-12 por mililitro se obtuvo con la fórmula:

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

$\sum C$	=	192	(suma de colonias de placas de dos diluciones sucesivas)
$n_1$	=	1	(número de placas consideradas en la 1ª diluc.)
$n_2$	=	2	(número de placas consideradas en la 2ª diluc.)
$d$	=	$10^{-5}$	(nivel de dilución correspondiente a la 1ª diluc.)

$$N = 16 \times 10^6 \text{ Escherichia coli k-12/ ml}$$

Un dato importante es la absorbancia del cultivo bacteriano de 18 horas, puesto que permite estimar, en relación con la dilución hecha, un número aproximado de bacterias, según la actividad de fosfatasa alcalina que muestren (Tabla 3)<sup>38</sup>.

**Tabla 2.** Diluciones de cultivo de 18 horas de *E. coli k-12* y absorbancias obtenidas a 550nm.

Dilución	Absorbancia (550nm)
1 : 1	0,967
1 : 2	0,582
1 : 4	0,337
1 : 8	0,208
1 : 16	0,115
1 : 32	0,054
1 : 64	0,029
1 : 128	0,015
1 : 256	0,006
1 : 512	0,002

Sobre la base de los procedimientos realizados anteriormente, se relacionó la cantidad de bacterias encontradas en el cultivo de 18 horas ( $16 \times 10^6$  *E. coli* / ml) con la actividad de fosfatasa alcalina para cada dilución, como se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Correspondencia entre la cantidad de *E. coli k-12* y la actividad de fosfatasa alcalina de las diluciones de cultivo bacteriano.

Dilución	<i>E. coli k-12</i> (N° bacterias / ml)	Fosfatasa alcalina (UI/l)
1 : 1	16.000.000	428,30
1 : 2	8.000.000	340,85
1 : 4	4.000.000	240,60
1 : 8	2.000.000	160,40
1 : 16	1.000.000	120,30
1 : 32	500.000	60,15
1 : 64	250.000	20,05
1 : 128	125.000	ND
1 : 256	62.500	ND
1 : 512	31.250	ND

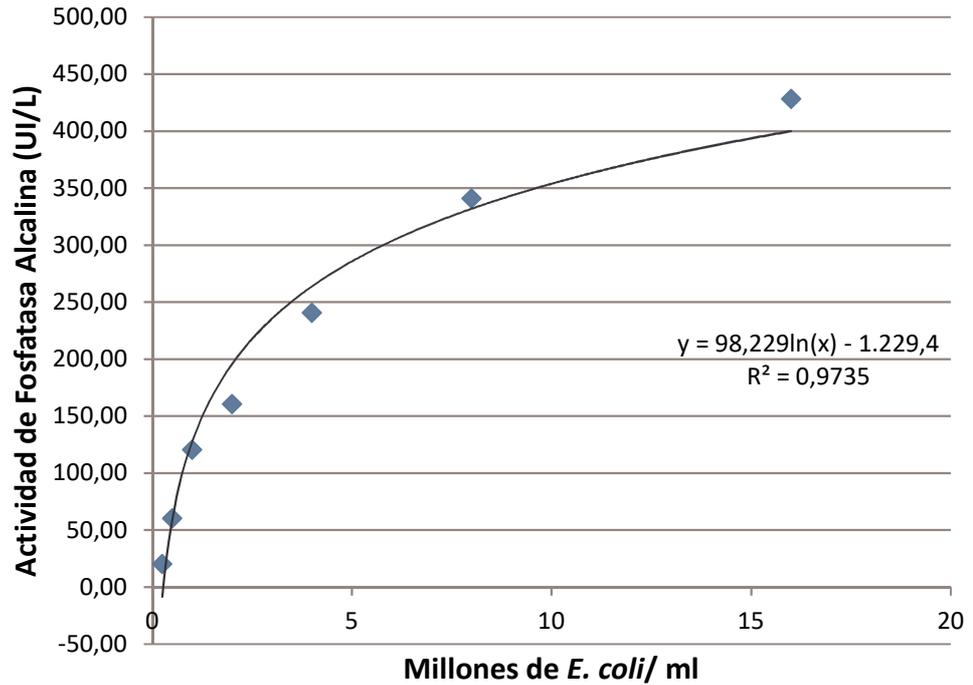
ND: No se detectó actividad de la enzima.

Teniendo en cuenta que la actividad de fosfatasa alcalina obtenida en cada dilución, correspondiente a un determinado número de bacterias, tiene una tendencia logarítmica (Fig. 4), la cantidad de bacterias ( $x$ ) se dedujo en función de la actividad de fosfatasa alcalina en UI/L ( $y$ ) mediante la ecuación:

$$x = e^{\left(\frac{y-a}{b}\right)}$$

Donde:

- $x$  = Número de bacterias esperado
- $e$  = Constante, base de logaritmo natural; igual a 2,7
- $y$  = Actividad de fosfatasa alcalina encontrada en función del número de bacterias según el modelo logarítmico:  
 $y = 98,229 \ln(x) - 1.229,4$ .
- $a$  = Término constante de la regresión; igual a  $- 1.229,4$ .
- $b$  = Razón de cambio de actividad de fosfatasa alcalina (UI/L) por cada unidad de cambio en el logaritmo natural del número de bacterias ( $x$ ); igual a 98,229.



**Figura 4.** Línea de tendencia de actividad de fosfatasa alcalina (UI/L) en función del número de bacterias por mililitro.

Según la ecuación, la actividad de fosfatasa alcalina (UI/L) encontrada en la muestra permitió estimar el número de bacterias por mililitro. Se describen ejemplos en la tabla 4.

**Tabla 4.** Ejemplos de estimación del número de bacterias/ml mediante detección de actividad de fosfatasa alcalina, según el modelo logarítmico  $y = 98,229 \ln(x) - 1.229,4$ .

Muestras de leche	Actividad de fosfatasa alcalina (UI/l)	Nº de Bacterias / ml
1	67,15	493.949
2	79,65	560.499
3	85,32	593.573
4	61,67	467.323
5	38,26	368.820
6	71,43	515.795

### 4.3. Validación interna de la prueba.

#### 4.3.1. Selectividad.

En este ensayo se realizó la detección de actividad de fosfatasa alcalina a dos grupos de seis muestras, uno con tratamiento térmico y otro sin él. Se evaluó el grado de interferencia que ocasiona la presencia de fosfatasa alcalina de otras fuentes.

**Tabla 5.** Actividad de fosfatasa alcalina de muestras de leche cruda para la validación por selectividad.

Determinación	Sin tratamiento térmico FA (UI/L)	Con tratamiento térmico FA (UI/L)
1	400,00	38,10
2	285,71	57,14
3	247,62	57,14
4	209,52	57,14
5	361,90	19,05
6	247,62	38,10
Media	365,08	55,56
Desv. Std.	92,42	19,44
CV (%)	25,31	34,99

#### a. Determinación de Interferencia.

La interferencia de fosfatasa alcalina de otras fuentes y otros metabolitos interferentes, se determinó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de interfeerencia} = \frac{D_i - D_s}{D_i} \times 100$$

Donde:

$D_i$  = Media de actividad de fosfatasa alcalina de muestras no sometidas a tratamiento térmico.

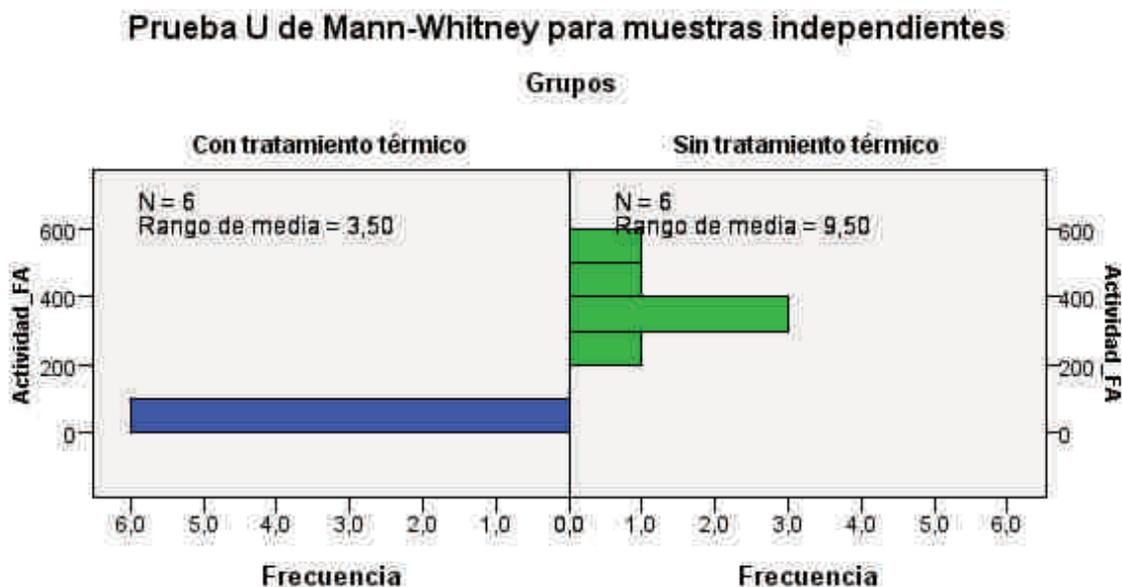
$D_s$  = Media de actividad de fosfatasa alcalina de muestras sometidas a tratamiento térmico.

$$\% \text{ de interfeerencia} = \frac{365,08 - 55,56}{365,08} \times 100 = 84,78$$

La interferencia de actividad de fosfatasa alcalina de otras fuentes resultó excesivamente elevada: 84,78%.

**b. Significación de la prueba (U de Mann-Whitney).**

Los datos, reunidos en dos grupos, se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes. Se encontró diferencias significativas entre las medianas de los grupos, con un nivel de significación de 0,002 ( $p=0,05$ ).



**Figura 5.** Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes. Se observan las frecuencias de los tratamientos de la leche cruda para validación de la selectividad.

**4.3.2. Linealidad.**

Para conocer la linealidad del método, se analizó una muestra de leche a cinco niveles de concentración, por triplicado. Estadísticamente lo correcto habría sido analizar diversas concentraciones en forma aleatoria, no obstante, la AEFI establece como criterio práctico, analizar la muestra en sentido creciente de concentración para minimizar posibles efectos de memoria del equipo<sup>35</sup>. Los resultados se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6.** Actividad de fosfatasa alcalina en diferentes niveles de concentración de una muestra de leche cruda para la validación por linealidad.

Nivel	Dilución	Actividad de FA (UI/L)	Promedios de Actividad de FA (UI/L) de cada nivel de concentración
1	1:1 (1)	666,67 404,76 523,81	531,75
2	1:2 (0,5)	357,14 261,90 261,90	293,65
3	1:4 (0,25)	214,29 190,48 119,05	174,60
4	1:8 (0,125)	142,86 119,05 71,43	111,11
5	1:16 (0,625)	95,24 71,43 47,62	71,43

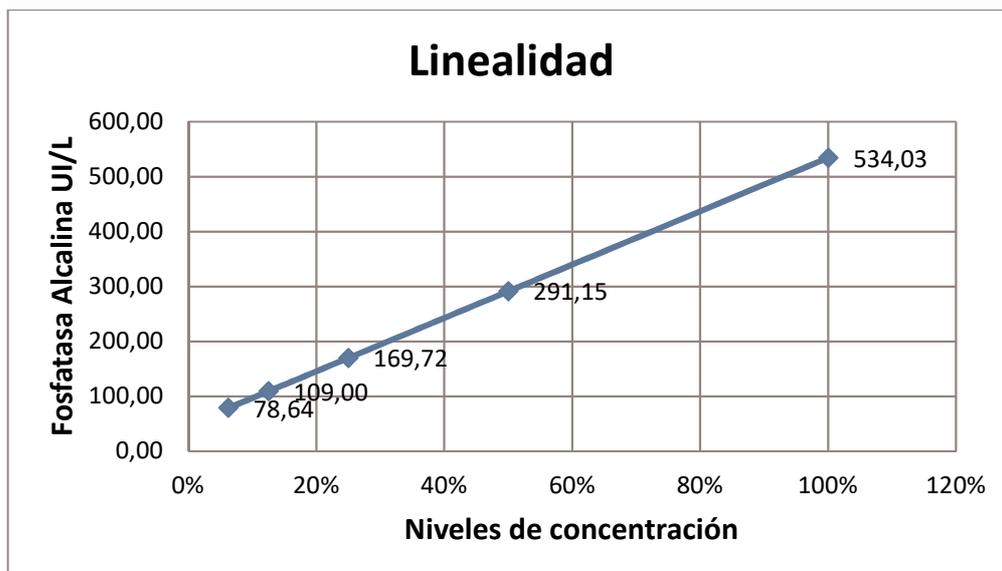
Para la comprobación estadística de linealidad se realizó:

**a. Ecuación de la recta. Pendiente y ordenada en el origen.**

Para construir la recta de regresión  $y = b * x + a$ , donde  $x$  es la concentración de la muestra,  $y$  la respuesta (actividad de fosfatasa alcalina en 1 ml de leche),  $b$  el valor de la pendiente y  $a$ , el término independiente u ordenada en el origen, se hallaron los valores de:

Pendiente: 
$$b = \frac{\sum(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sum(x-\bar{x})^2} \quad b = 485,74$$

Ordenada en el origen: 
$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad a = 48,28$$



**Figura 6.** Recta de regresión lineal de detección de actividad de fosfatasa alcalina de origen microbiano en leche cruda.

**b. Coeficiente de correlación ( $r$ )**

Para encontrar el grado de relación entre las concentraciones de la muestra y los niveles de actividad de fosfatasa alcalina encontrados, se determinó el coeficiente de correlación:

$$r = \frac{\sum(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum(x-\bar{x})^2 \sum(y-\bar{y})^2}} \quad r = 0,999$$

El valor encontrado nos indica que existe relación positiva entre la concentración fosfatasa alcalina (en leche) y el valor de la actividad de la enzima, evaluados (en UI/l).

**c. Coeficiente de determinación ( $r^2$ )**

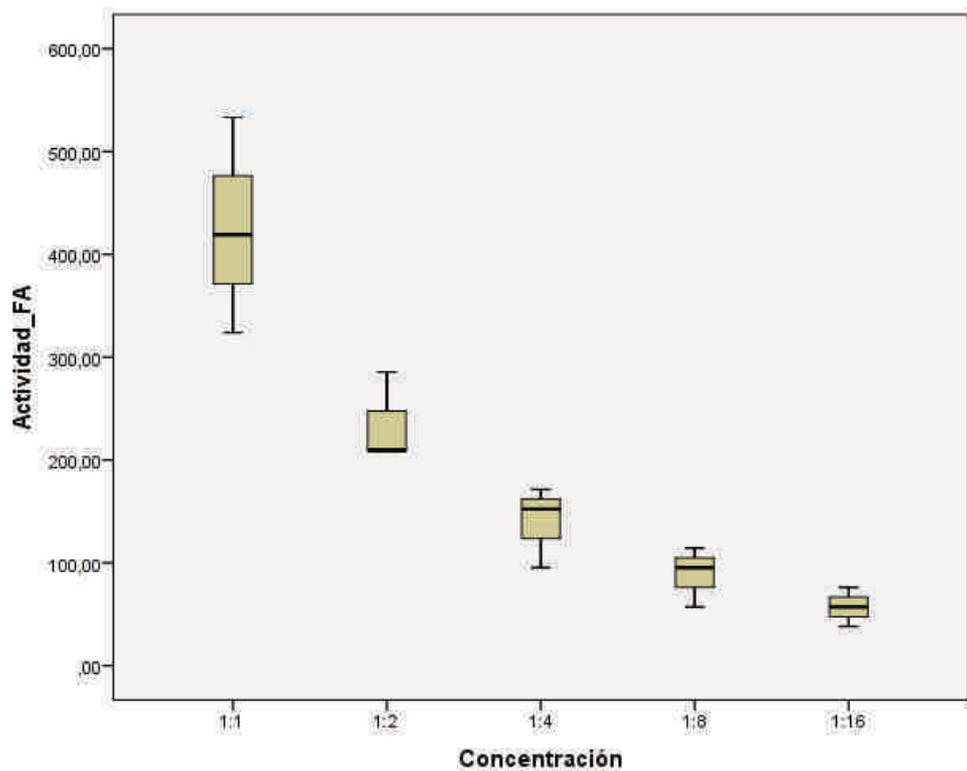
El coeficiente de determinación, medido en porcentaje, se determinó por la diferencia entre la unidad y el cociente de la varianza residual entre la varianza de la variable dependiente (actividad de fosfatasa alcalina en UI/l):

$$r^2 = 1 - \frac{\sigma_r^2}{\sigma^2} \quad r^2 = 99,8\%$$

Por lo tanto, el 99,8% de la variación de la actividad de fosfatasa alcalina en la muestra, se explica por la variabilidad de la concentración de la enzima en dicha muestra, la cual depende de las fuentes productoras de dicha enzima.

#### d. Análisis de las varianzas (ANOVA)

La homogeneidad de varianzas se efectuó con el test de Levene, el cual resultó 1,946, con un p-valor de 0,179; por lo tanto, se demostró que existe homocedasticidad, es decir, las varianzas de la actividad de fosfatasa alcalina analizada a diferentes concentraciones, son homogéneas.



**Figura 7.** Comparación de las varianzas de las distintas concentraciones de leche cruda y su actividad de fosfatasa alcalina, analizadas en la prueba de linealidad.

#### 4.3.3. Precisión.

Después de ensayar el procedimiento diez veces, con la finalidad de determinar el grado de concordancia de la prueba, en las mismas condiciones de análisis (equipo, operador, reactivos, tiempos, temperaturas, etc.), se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Actividad de fosfatasa alcalina en una muestra de leche cruda para la validación por precisión.

Determinaciones	Abs. para FA en 200 $\mu$ l de muestra	FA (UI/l) en 1 ml de muestra
1	0,022	523,81
2	0,023	547,62
3	0,029	690,48
4	0,024	571,43
5	0,028	666,67
6	0,025	595,24
7	0,023	547,62
8	0,025	595,24
9	0,026	619,05
10	0,031	738,10
Media		609,52
Desviación Std.		69,37
CV (%)		11,38

#### **Coefficiente de Variación.**

El coeficiente de variación encontrado (11,38%) sugiere realizar cuatro repeticiones para con un intervalo de aceptación de 85-115% ( $p=0.01$ ), según la AEFI<sup>35</sup>.

#### **4.3.4. Exactitud.**

Después de procesar seis muestras de leche a las cuales se les determinó actividad de fosfatasa alcalina y numeró coliformes totales por mililitro, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8.** Cuantificación de bacterias mediante detección de actividad de fosfatasa alcalina y su relación con NMP de coliformes (ISO 7251) en muestras de leche cruda para validación de exactitud.

Análisis	Fosfatasa Alcalina (UI/l) en Leche	Nº de Bacterias/ml según sistema de FA	Nº de Bacterias/ml según NMP*
1	138,10	1.012.119	240.000.000
2	109,52	758.163	240.000.000
3	104,76	722.522	1.100.000.000
4	66,67	491.541	460.000.000
5	171,43	1.417.790	240.000.000
6	123,81	875.986	240.000.000
Media	119,05	879.686.88	420.000.000
Desviac. Std.	35,12	315.351,57	344.557.687,5
Varianza	1.233,56	9,945 x 10 <sup>10</sup>	1,187 x 10 <sup>17</sup>

\* Factor de dilución encontrado para multiplicar coeficiente NMP: 10<sup>6</sup>.

La prueba de Levene fue 6,955 con un p-valor de 0,025 ( $p < 0,05$ ); lo cual significa que no existe homogeneidad de varianzas de ambos procedimientos, concluyéndose que sus exactitudes son diferentes.

#### 4.3.5. Límite de detección y límite de cuantificación.

Al ensayar diluciones decrecientes del analito en la matriz (fosfatasa alcalina en leche), desde 1:1 hasta 1:16, solo se detectó actividad de fosfatasa alcalina en los dos primeros grupos, es decir en la muestra sin diluir (1:1) y en la diluida al medio (1:2). El equipo no detectó actividad en los siguientes niveles de dilución. Los resultados se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Actividad de fosfatasa alcalina en dos niveles de concentración de una muestra de leche cruda para validación de límite de detección y cuantificación.

Grupos	Dilución	Abs. para FA (520nm)	Actividad de FA (UI/l)	N° de Bacterias/ml estimado
1	1:1	0,010	46,73	401.795
	1:1	0,009	42,06	383.252
	1:1	0,011	51,40	421.236
	1:1	0,010	46,73	401.795
	1:1	0,010	46,73	401.795
	1:1	0,005	23,36	317.250
2	1:2	0,003	14,02	288.643
	1:2	0,001	4,67	262.614
	1:2	0,002	9,35	275.321
	1:2	0,001	4,67	262.615
	1:2	0,004	18,69	302.609
	1:2	0,002	9,35	275.321

**a) Límite de Detección.**

Aplicando la fórmula para calcular el límite de detección se obtuvo:

$$CL = \frac{K * S_{bl}}{b \sqrt{n}} \quad CL = \frac{3 (36,75)}{485,74 \sqrt{6}} = 0,093 \text{ UI/l}$$

El límite de detección hallado: 0,093 UI/l, equivale a un estimado de 250.730 bacterias/ml, productoras de la actividad de fosfatasa alcalina.

**b) Límite de Cuantificación.**

Aplicando la fórmula para calcular el límite de cuantificación se obtuvo:

$$CL = \frac{K * S_{bl}}{b \sqrt{n}} \quad CL = \frac{10 (36,75)}{485,74 \sqrt{6}} = 0,309 \text{ UI/L}$$

El límite de cuantificación equivale a un estimado de 251.278 bacterias/ml, productoras de la actividad de fosfatasa alcalina.

## V. DISCUSIÓN.

La problemática ambiental de nuestro país y de manera especial, en nuestra localidad, es la contaminación de alimentos; más la antropogénica que la producida de manera natural. Es en todo momento necesario, vigilar la calidad de un alimento que constituye la canasta básica familiar como la leche<sup>39</sup>.

Para vigilar, controlar y asegurar la buena calidad fisicoquímica, bromatológica y microbiológica, se requiere de métodos analíticos que brinden datos en tiempo real. Los métodos tradicionales implican determinaciones robustas, reproducibles y con capacidad de alcanzar niveles de detección del orden de partes por trillón, como los métodos cromatográficos; sin embargo, son costosos e implican tratamientos muy exhaustivos de la muestra<sup>18</sup>.

Como se ha demostrado, la prueba microbiológica que determina la aptitud de la leche para consumo humano es el NMP de coliformes<sup>2</sup>; sin embargo, por el tiempo de diagnóstico que demanda la prueba, se planteó la propuesta desarrollada en esta investigación.

En la revisión sobre métodos para la rápida detección de patógenos transmitidos por alimentos hecha por Mandal y colaboradores<sup>40</sup>, se explicaba que hace pocos años existía la necesidad de más investigaciones sobre técnicas de separación de microorganismos de la matriz alimentaria y su concentración, antes que solo su detección. Estas, basadas en ensayos inmunológicos y genómicos. Actualmente se conoce que los métodos son basados en técnicas de biología molecular, inmunología y principios biofísicos y bioquímicos con aplicación de biosensores. Es indudable que estos permitirán una rápida detección en tiempo real.

La idea de proponer un método que se relacione con el NMP de coliformes para abreviar la detección de estos microorganismos en leche, utilizando los fundamentos del funcionamiento de un biosensor, fue motivada por las características típicas de este, como alta sensibilidad, alta selectividad, tiempo de análisis corto, manejo sencillo, automatizable, entre otros. Se escogió a *Escherichia coli* k-12, coliforme y principal indicador de contaminación de alimentos<sup>41</sup>. Se eligió fosfatasa alcalina, debido a su fácil determinación y a que su topología permitía una extracción sencilla basada en la lisis de la pared celular<sup>34, 42-44</sup>.

Se evaluó la actividad de la enzima en diferentes concentraciones de la bacteria por la técnica con fenil fosfato de sodio en medio alcalino

tamponado con 4-aminoantipirina en aminometil propanol, una técnica utilizada en suero sanguíneo<sup>42</sup>. La actividad enzimática en las concentraciones bacterianas mostró una tendencia logarítmica cuando los valores fueron analizados con Microsoft Excel v.2012 (Fig. 4).

Si bien es cierto, el modelo propuesto (que sigue un patrón logarítmico) sirvió para estimar la cantidad de bacterias en función de la actividad de fosfatasa alcalina, debe indicarse que dicha estimación solo corresponde a la cepa de *E. coli* analizada. De tal manera que podría proponerse una investigación para evaluar la actividad de fosfatasa alcalina tanto en diferentes cepas como en diferentes condiciones de crecimiento.

Por otro lado, los métodos de detección indirecta o los que se basen en fenotipos microbianos quizá tengan muchas limitaciones. Las técnicas que se orienten a establecer sistemas de microbiología molecular, es decir las basadas en detección de ácidos nucleicos, podrían tener mayor especificidad y precisión<sup>45</sup>.

El control de patógenos en alimentos siempre será un punto crítico de control en el sistema HACCP, por lo que actualmente es una tarea permanente; precisamente por sus implicancias en la salud pública. Como la leche es un alimento que aún se sigue distribuyendo en programas de asistencia social de gobiernos locales en Perú, fue necesario orientar la investigación hacia este sector.

Pareciera que los países desarrollados no tuvieran el problema de contaminación de leche por patógenos, precisamente porque la legislación les obliga a pasteurizar la leche antes de ser expendida; sin embargo, los brotes de enfermedades en granjas lecheras y la transmisión de *Listeria monocytogenes*, por ejemplo, ha ocurrido porque los trabajadores agrícolas y sus familias consumen leche sin pasteurizar<sup>46</sup>.

La pasteurización de la leche es una acción importante previa a su consumo, pues garantiza su inocuidad. Uno de los parámetros de control de la pasteurización es medir la actividad de fosfatasa alcalina; su detección es signo de una pasteurización deficiente<sup>47</sup>. Cuando se proyectó la investigación reportada en este informe, se planteó la hipótesis que sustenta la presencia de coliformes como *E. coli*, con actividad de fosfatasa alcalina<sup>48</sup> en la leche. Y, por lo tanto, significaría una manera de detectarla y cuantificarla.

Aunque existen varios métodos para la detección de la enzima<sup>49, 50</sup> y la metodología de detección propuesta por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) es la fluorimétrica<sup>51</sup>, en esta investigación se

optó por la colorimétrica por ser económica, sencilla, con tiempo de análisis corto, entre otras propiedades, pensando en las características de los biosensores<sup>10</sup>.

Pensando en la validación interna de la técnica propuesta, se hizo una revisión de documentos de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria<sup>35</sup>, Oficina de administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos de Norteamérica (FDA)<sup>36</sup> y manuales para el control de calidad de alimentos de la FAO<sup>37, 52</sup>. También se revisó la legislación peruana al respecto para alinear la propuesta<sup>53</sup>.

Para validar la selectividad de la técnica había que tratar dos grupos de muestras, uno con el analito (fosfatasa alcalina) y otro sin él. Mientras que la norma técnica colombiana para determinación de actividad de fosfatasa alcalina por método fluorimétrico señala que la muestra para el control negativo debe someterse a 95°C por un minuto<sup>54</sup> y la propuesta de Park & Kang<sup>28</sup>, sobre cuantificación de bacterias por actividad de fosfatasa alcalina en espinaca: 75°C por un minuto, para el caso de esta investigación, la muestra se sometió a 100°C (baño de agua hirviente) por cinco minutos, de tal manera que se pueda eliminar fosfatasa procedente de otras fuentes<sup>55</sup>.

Al evaluar el porcentaje de interferencia que producen otras sustancias, se encontró 84,78%, lo cual sugiere una contaminación de la leche con detergentes fosfatados, producto del lavado de envases de recolección; ya que los glóbulos de grasa, se disuelven con el SDS 0,1% y la enzima encerrada en estos se destruye por el calor<sup>55, 56</sup>. Esta interferencia se constituye en una gran limitación de la técnica.

Para comprobar si existen o no diferencias significativas entre los grupos de muestras analizados (con y sin el analito), cuando se efectúa la validación del ensayo por selectividad, la prueba U de Mann-Whitney mostró un p-valor de 0,0022. Esto significa, que tanto las muestras que han sufrido tratamiento térmico, como las que no ha sido sometidas al calor, son significativa y estadísticamente diferentes. Por lo tanto, la prueba es selectiva, pero se ve afectada por sustancias interferentes, lo que la hace escasamente específica.

La linealidad de la técnica se comprobó evaluando cinco grupos de una misma muestra a diferentes concentraciones. Los resultados analizados en Microsoft Excel v. 2012, mostraron linealidad, con un valor de la pendiente de 485,7. La prueba es lineal hasta 534 UI/l, lo cual estima un aproximado de 62,5 millones de bacterias con actividad de fosfatasa alcalina. Se corroboró el hecho de que existe correlación entre las

concentraciones del analito en la muestra y sus respuestas, con un coeficiente de Pearson equivalente a 0,99 y un coeficiente de determinación de 99,8%.

Fue necesario comprobar la homogeneidad de varianzas en cada uno de los grupos analizados (de diferentes concentraciones). El análisis de varianzas con el test de Levene resultó con un valor de 1,946 en un nivel de significancia de 0,179, lo que determinó la existencia de homocedasticidad; es decir, que los resultados obtenidos en las diferentes concentraciones analizadas, muestran varianzas homogéneas. En este ensayo, se ha demostrado que existe linealidad hasta 534 UI/l, sin embargo, ensayos similares como el de Wiener, aplicado a suero sanguíneo, reporta una linealidad hasta 800 UI/l<sup>42</sup>.

Al evaluar la precisión del ensayo, analizando diez veces una misma muestra, con las mismas condiciones de prueba: el mismo equipo y el mismo analista, el coeficiente de variación (CV) resultó 11,38%. Según Camacho et al, 1993 (citado por AEFI)<sup>35</sup>, de acuerdo con el CV encontrado, se estableció que el número de repeticiones para tener un valor aceptable de actividad de fosfatasa alcalina por esta técnica, fue cuatro.

Para efecto de validación de la exactitud del ensayo, se eligió el método ISO 7251 (NMP), ya que corresponde a la cuantificación de *Escherichia coli*, principal indicador de la contaminación de alimentos considerado en la legislación nacional<sup>2, 33</sup>. Para compararlas, se determinó la media, desviación estándar y varianza de cada una. En este punto fue necesario evaluar la homogeneidad de varianzas de ambas con el test de Levene. Este resultó 6,95 con un nivel de significancia de 0,025. De esta manera se pudo establecer que la técnica propuesta y la del NMP tienen exactitudes diferentes, lo cual sugiere falta de relación, a pesar que *E. coli* es la bacteria representativa de los coliformes.

Para la evaluación de los límites de detección y cuantificación del ensayo, así como para la exactitud, se tomó en cuenta la tendencia logarítmica que mostró esta técnica. Esto permitió estimar la cantidad de bacterias productoras de actividad de fosfatasa alcalina por mililitro. Aunque hubo diferencias entre el límite de detección de actividad de la enzima (0,093 UI/l) y el límite de cuantificación (0,309 UI/l), la cantidad de bacterias estimadas fue similar. Finalmente, se debe tener en cuenta que, según lo propuesto por la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria y lo establecido en este informe, el número de bacterias con actividad de fosfatasa alcalina por mililitro que debe aceptarse como valor inferior

mínimo, es el que resulta de la estimación obtenida a partir del límite de cuantificación, es decir 251.278 bacterias /ml.

La intención de proponer una técnica económica y sobre todo rápida, como la implementada desde 1975, con la comercialización del “enzyme electrode” por Yellow Springs Instrument Company<sup>10</sup>, ha compartido la inquietud científica en el inicio del siglo XXI, el cual se ha revestido de sistemas de detección en tiempo real, especialmente en campos donde es necesario tener conocimiento de riesgos para la salud.

La propuesta para detección de bacterias contaminantes de la leche a través de la actividad de fosfatasa alcalina, específicamente de *Escherichia coli*, principal indicador de polución alimentaria, resultó ser similar a otras investigaciones como la realizada por Park & Kang, para conteo bacteriano en espinaca<sup>28</sup>.

Como se ha expresado líneas arriba, queda la inquietud de conocer diferencialmente la actividad de fosfatasa alcalina de fuentes que contaminan la leche, de tal manera que podamos hacer una estimación más específica del grupo de bacterias que se encuentran en este alimento, rico en nutrimentos, vitaminas y minerales.

Queda pendiente realizar investigaciones sobre la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, debido a la cual se ha clasificado a las bacterias coliformes<sup>49, 57</sup>. La decisión de no evaluar esta enzima en esta investigación se debió al elevado costo de los insumos.

Por último, quizá pueda pensarse en evaluar cada bacteria coliforme, utilizando anticuerpos específicos o aptámeros<sup>10, 15, 50, 58</sup>, pero es materia de generar la línea de investigación interdisciplinaria, aún incipiente en nuestro medio. Por lo que se hace necesario tener siempre en cuenta la fisiología y el metabolismo bacteriano<sup>59</sup>.

## VI. CONCLUSIONES.

- 6.1. La evaluación de la actividad de fosfatasa alcalina en las muestras de leche cruda analizadas permitió estimar el número de bacterias productoras de la enzima.
- 6.2. La cuantificación de bacterias mostró una tendencia logarítmica, esto permitió conocer que el valor inferior mínimo de cuantificación de 251.278 bacterias/ml, teniendo como base una cepa de *Escherichia coli k-12*.
- 6.3. La selectividad del ensayo no fue satisfactoria debido a que se encontró 84,78% de interferencia; es decir, a pesar de los procedimientos realizados, se encontró actividad de fosfatasa alcalina de otras bacterias.
- 6.4. La técnica propuesta no resultó específica para detectar actividad de fosfatasa alcalina de coliformes.
- 6.5. La técnica ensayada mostró linealidad hasta 534 UI/l. El coeficiente de correlación fue 0,99 y el coeficiente de determinación, 99,8%.
- 6.6. La precisión del ensayo propuesto tuvo un coeficiente de variación del 11,38%, lo cual indicó que debe realizarse cuatro repeticiones para obtener un valor aceptable de actividad de fosfatasa alcalina.
- 6.7. Se comparó el sistema de detección de actividad de fosfatasa alcalina con la técnica del número más probable, según ISO 7251, concluyendo que ambas técnicas tienen exactitudes diferentes.
- 6.8. Se estableció como límite de detección 0,093 UI/L de actividad de fosfatasa alcalina y como límite de cuantificación, 0,309 UI/L de actividad de fosfatasa alcalina.

## **VII. RECOMENDACIONES.**

Como resultado de la investigación, se recomienda lo siguiente:

- 7.1. Evaluar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en los coliformes más frecuentes de contaminación de leche en nuestra zona.
- 7.2. Realizar la cuantificación de la actividad, ya sea de fosfatasa alcalina como de  $\beta$ -galactosidasa, de diferentes cepas de bacterias para poder estimar el número de bacterias en una muestra de alimento.
- 7.3. Ensayar técnicas de evaluación de actividad de fosfatasa alcalina que resulten específicas para un determinado microorganismo o tipo de alimento.
- 7.4. Realizar investigaciones que involucren la tecnología de biosensores con aplicación en alimentos de alto riesgo como el ceviche.

## VIII. REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS.

1. Brack, A. & Mendiola, C. Ecología del Perú. 2ª ed. Perú: Asociación Editorial Bruño; 2004.
2. “Norma que establece los criterios microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano”. Resolución Ministerial N° 591-2008/MINSA del 27 agosto 2008. Diario Oficial El Peruano – Normas Legales: 29 agosto 2008; pág. 378827.
3. Reglamento de la Ley e Inocuidad de los alimentos D.S. N° 034-2008-AG del 17 diciembre 2008. Diario Oficial el Peruano – Normas Legales: 17 diciembre 2008; pág. 385293- 98.
4. Dirección General de Epidemiología-Perú [sede web]. Subsistemas de vigilancia epidemiológica: Emergencias sanitarias de notificación obligatoria [acceso: 2016 febrero 24]. Disponible en: [www.dge.gob.pe/ve\\_subsist\\_brotes.php](http://www.dge.gob.pe/ve_subsist_brotes.php)
5. Dirección General de Epidemiología-Perú. [sede web]. Las enfermedades diarreicas agudas en el Perú [acceso: 2016 mayo 23]. 2016. Bol. Epidemiol. 25 (2): 27-28. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2016/02.pdf>
6. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. Microbiología de los alimentos. España: Acribia; 2001.
7. Biotecon Diagnostics [sede web]. PCR kit for the qualitative detection of *Escherichia coli* serotype O157 (including *Escherichia coli* O157:H7) DNA using the LightCycler® Carousel-Based System [Acceso: 2016 febrero 29]. Disponible en: [www.bc-diagnostics.com/?cid=1195567961&lang=1&name=Real-time+PCR](http://www.bc-diagnostics.com/?cid=1195567961&lang=1&name=Real-time+PCR)
8. Instrumentación Científica Técnica, SL [Sede Web] Kit de control de Higiene de superficies [Acceso: 2016 febrero 28]. Disponible en: [www.ictsl.net/plaintext/productos/021b07961a0ad1e34/0000009c4108dbe01.html](http://www.ictsl.net/plaintext/productos/021b07961a0ad1e34/0000009c4108dbe01.html)
9. Giacometti F, Serraino A, Finazzi G, Daminelli P, Losio MN, Arrigoni N, Piva S, Florio D, Riu R, Zanoni RG. Sale of raw milk in northern Italy: food safety implications and comparison of different analytical methodologies for detection of foodborne pathogens. Foodborne Pathog Dis. 2012; 9(4): 293-7
10. Sistema Madrid [Sede Web]. España: Fundación para el conocimiento madrid+d; 2005 [Acceso: 2016 febrero 28]. De Gonzales Rumayor V, García Iglesias E, Ruiz Galán O, Gago Cabezas L. Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. Disponible en: [http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/VT/VT1\\_Aplicaciones\\_de\\_biosensores\\_en\\_la\\_industria\\_agroalimentaria.pdf](http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/VT/VT1_Aplicaciones_de_biosensores_en_la_industria_agroalimentaria.pdf)

11. Perú 21. Qali Warma: 90 escolares de Lambayeque fueron hospitalizados por intoxicación. [Internet] 2014 [acceso: 2016.05.28] Disponible en:  
<http://peru21.pe/actualidad/qali-warma-90-escolares-lambayeque-fueron-hospitalizados-intoxicacion-2202421>
12. Rankin SA, Christiansen A, Lee W, Banavara DS, López-Hernández A. Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. *J Dairy Sci.* 2010; 93: 5538-5551.
13. Gonzales M. UF1281: Elaboración de leches para el consumo. Málaga-España: IC; 2013.
14. Montañez JL, Ramos EG, Alegret S, Delgado RJ. Biosensor de glucosa basado en un biocompósito disperse de graffito-epoxi-platino-glucosa oxidase. *Información tecnológica [En línea]* 2011 [acceso: 2016 marzo 1]; 22 (1): 29-40. Disponible en:  
<http://www.scielo.cl/pdf/infotec/v22n1/art05.pdf>
15. Mortari A, Lorenzelli L. Recent sensing technologies for pathogen detection in milk: A review. *Biosensors and Bioelectronics.* 2015; 60: 8-21.
16. Nayak M, Kotian A, Marathe S, Chakravorty D. Detection of microorganisms using biosensors - A smarter way towards detection techniques. *Biosensors and Bioelectronics.* 2009; 25: 661–667.
17. Dornelles L, Tatsuo L. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem.* 2002; 77 (2): 237-256.
18. Jiménez C, León D. Biosensores: Aplicaciones y Perspectivas en el Control y Calidad de Procesos y Productos Alimenticios. *Vitae, Fac Quim Farm UA.* 2009; 16 (1): 144-154.
19. Leonard P, Hearty S, Brennan J, Dunne L, Quinn J, Chakraborty T et al. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme and Microbial Technology.* 2003; 32 (1): 3-13.
20. Michelini E, Guardigli M, Magliulo M, Mirasoli M, Roda A. Bioluminescent biosensors based on genetically engineered living cells in environmental an food analysis. *Analytical letters.* 2006; 39: 1503-1515.
21. Ercole C, Gallo M, Pantalone M, Santucci S, Mosiello L, Laconi C et al. A biosensor for *Escherichia coli* based on a potentiometric alternating biosensing (PAB) transducer. *Sensors & Actuators B: Chemical,* 2002; 83 (1-3): 48-53.
22. Maraldo D, Mutharasan R. 10-minute assay for detecting *Escherichia coli O157:H7* in ground beef samples using piezoelectric-excited millimeter-size cantilever sensors. *J Food Prot.* 2007; 70 (7): 1670-7.

23. Kumar VK. Adsorption of microorganisms on single-walled carbon nanotubes and other porous media [Doctoral thesis in Chemical Engineering] New Mexico: New Mexico State University; 2007.
24. Liu Y, Li Y. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic separation and absorbance measurement. *J. Microbiol Methods*. 2002; 51 (3): 369-377.
25. Almadidy A, Watterson J, Piunno PSA, Foulds IV, Horgen P, Ulrich K. A fibre-optic biosensor for detection of microbial contamination. *Can. J. Chem*. 2003; 81: 339-349
26. Huang YM, Hsu HY, Hsu ChL. Development of electrochemical method to detect bacterial count, *Listeria monocytogenes*, and somatic cell count in raw milk. *J. Taiwan Insitute of Chem Engineers* [in press]. 2016; 1-6
27. Maraldo D, Mutharasan R. Preparation-free method for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of spinach, spring lettuce mix, and ground beef particulates. *J Food Prot* 2007; 70 (11): 2651-5.
28. Park EJ, Kang DH. The use of bacterial alkaline phosphatase assay for rapid monitoring of bacterial counts on spinach. *J Food Sci*. 2008; 73 (5): M236-8.
29. Liu JT, Settu K, Tsai JZ, Chen ChJ. Impedance sensor for rapid enumeration of *E. coli* in milk samples. *Electrochimica Acta*. 2015; 182: 89-95.
30. Boyaci IH, Aguilar ZP, Hossain M, Halsall HB, Seliskar CI, Heineman WR. Amperometric determination of live *Escherichia coli* using antibody-coated paramagnetic beads. *Anal Bioanal Chem* 2005; 382 (5): 134-41.
31. Mittelman AS, Ron EZ, Rishpon J. Amperometric quantification of total coliforms and specific detection of *Escherichia coli*. *Anal Chem* 2002; 74 (4): 903-7.
32. Pascual Anderson MR, Calderón y Pascual V. *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. 2<sup>a</sup> ed. España: Díaz de Santos; 2000.
33. Da Silva N, Taniwaki MH, Junqueira VCA, Silveira NFA, do Nascimento MS, Gomes RAR. *Microbiological examination, Methods of food and water*. New York – USA: CRC Press; 2013.
34. Marolda CL, Li B, Lung M, Yang M, Hanuszkiewicz A, Roa A et al. Membrane Topology and Identification of Critical Amino Acid Residues in the Wzx O-Antigen Translocase from *Escherichia coli* O157:H4. *J. Bacteriol*. 2010; 192 (23): 6160-6171.
35. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. *Validación de Métodos Analíticos* [Monografía]. España: AEFI; 2001.

36. U.S. Food and Drug Administration [Sede Web]. Guidance for Industry-Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. USA: FDA-CDER-CBER; 1996. [Acceso: 2016 marzo 9] Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073384.pdf>
37. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). [Sede Web]. Manuales para el Control de Calidad de los Alimentos. 14: La Garantía de la Calidad en el Laboratorio Químico de Control de los Alimentos. (Estudio FAO: Alimentación y Nutrición - 14/14) 1996 [Acceso: 2016 marzo 9]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/T0845S/t0845s00.htm#Contents>
38. Harley JP, Prescott LM. Laboratory exercises in microbiology. 5<sup>th</sup> ed. USA: Mc Graw-Hill Companies; 2002.
39. Brousett-Minaya M, Torres Jimenez A, Chambi Rodriguez A, Mamani Villalba A, Gutierrez Samata H. Calidad fisicoquímica, microbiológica y toxicológica de leche cruda en las cuencas ganaderas de la región Puno-Perú. Scientia Agropecuaria [revista en línea] 2015 [acceso: 2016 junio 25] 6(3): 165-176. Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/issue/view/174>
40. Mandal PK, Biswas AK, Choi K, Pal UK. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. Am J Food Tech. 2011; 6(2): 87-102.
41. Pascual Anderson MR. Enfermedades de origen alimentario: su prevención. España: Díaz de Santos; 2005.
42. Wiener Lab. Fosfatasa alcalina optimizada, kit de determinación de fosfatasa alcalina en suero; Argentina: Wiener Lab; 2016.
43. Invitrogen. PureLink ® Genomic DNA kits. USA: Life Technologies; 2012. Disponible en: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink\\_genomic\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf)
44. Zaheer R, Morton R, Proudfoot M, Yakunin A, Finan TM. Genetic and biochemical properties of an alkaline phosphatase PhoX family protein found in many bacteria. Environ Microbiol. 2009 Jun; 11 (6):1572-87.
45. Chandler DO. Advances towards integrated biodetection systems for environmental molecular microbiology. Curr Issues Mol. Biol. 2002; 4: 19-32.
46. Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. Foodborne pathogens and disease. 2005; 2 (2): 115-129
47. García Garibay M, Quintero Ramírez R, López-Munguía A. Biotecnología Alimentaria. México: Limusa S.A.; 2004.

48. Kim BH, Gadd GM. Bacterial Physiology and Metabolism. USA: Cambridge University Press; 2008.
49. Wehr HM, Frank, JF. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 19<sup>th</sup> ed. Washington DC, USA: American Public Health Association; 2004.
50. Roca P, Oliver J, Rodriguez A. Bioquímica: Técnicas y Métodos. España: Hélice; 2003.
51. Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). Official Methods of analysis. 20<sup>th</sup> ed. AOAC Official Method 991.24 - Alkaline Phosphatase Activity in Fluid Dairy Products. Fluorometric Method. USA; 2016.
52. OMS-FAO. Codex Alimentarius. Producción de Alimentos de Origen animal. 2a ed. Roma: OMS-FAO; 2009.
53. Guía para la validación de métodos de ensayo y las directrices para la implementación y evaluación de métodos de ensayo sensoriales. Resolución de la Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales N° 0008-2003/INDECOPI-CRT, del 16 enero 2003. Diario Oficial El Peruano – Normas Legales: 1 febrero 2003; pág. 238363-66.0.
54. Instituto colombiano de normas técnicas y certificación. NTC 5026: Leche y productos lácteos. Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina usando un método fluorimétrico; Bogotá: Icontec; 2001.
55. Alais Ch, Lacasa A. Ciencia de la Leche: Principios de técnica lechera. España: Reverté S.A.; 1985.
56. C&D-Centrífugas & Decanters [Sede Web] Desarrollos en separación de crema de leche; 2012 [2016 marzo 15]. Disponible en: [http://www.centrifugesdecanter.com.ar/Ind\\_lactea.htm](http://www.centrifugesdecanter.com.ar/Ind_lactea.htm)
57. Betancor L, Luckarif HR, Seo JH, Brand O, Spain JC. Three-dimensional immobilization of beta-galactosidase on a silicon surface. Biotechnol Bioeng 2008; 99 (2): 261-7
58. Velusamy V, Arshak K, Korostynska O, Oliwa K, Adley C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. J.biotechadv. 2010; 28: 232-254.
59. Kim BH, Gadd GM. Bacterial Physiology and Metabolism. USA: Cambridge University Press; 2008.

## IX. ANEXOS.

### 9.1. Tabla NMP para 3x0,1 g (mL); 3x0,01 g (mL) y 3x0,001 g (mL)

Número de resultados positivos			Coeficiente NMP/g	Límite de confianza del 95%	
0,1 g	0,01 g	0,001 g		Inferior	Superior
0	0	0	< 3	-	-
0	1	0	3+	< 1	17
1	0	0	4	< 1	21
1	0	1	7+	2	27
1	1	0	7	2	28
1	2	0	11+	4	35
2	0	0	9	2	38
2	0	1	14+	5	48
2	1	0	15	5	50
2	1	1	20+	7	60
2	2	0	21	8	62
3	0	0	23	9	130
3	0	1	39	10	180
3	1	0	43	10	210
3	1	1	75	20	280
3	2	0	93	30	380
3	2	1	150	50	500
3	2	1	210+	80	640
3	3	0	240	90	1 400
3	3	1	460	100	2 400
3	3	2	1 100	300	4 800
3	3	3	> 1 100	-	-

Los resultados normales, obtenidos en el 95% de los ensayos, no están seguidos por un más. Resultados “+” improbables, obtenidos en un 4% de los casos, si están seguidos por un “+”.

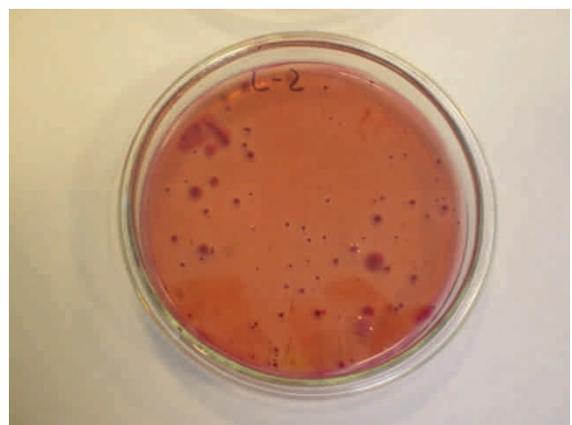
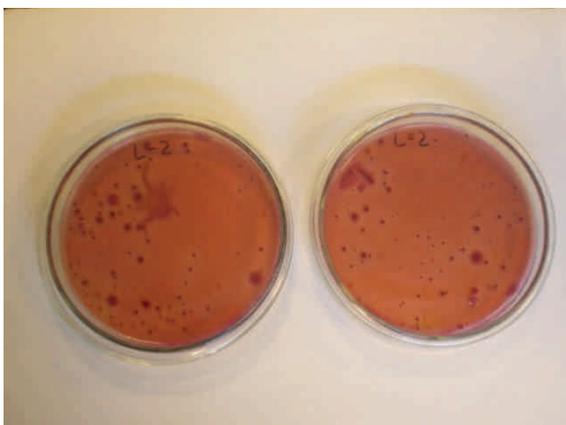
Las combinaciones de los tubos positivos que no se muestran en la tabla, aparecen menos del 1% de los ensayos; si se observan a menudo, significa que la técnica empleada es defectuosa o que las suposiciones en las que se basa el NMP estimado no se han cumplido. Para estas combinaciones que no se reflejan en la tabla se puede extrapolar un NMP a partir de la siguiente combinación más elevada que aparece en la tabla (por ejemplo, un caos 2 0 2 tendría resultado aproximado de 20, que es el NMP correspondiente al caso 2 1 1).

9.2. Fotografías de los ensayos.

Toma de muestra.



Cuantificación de bacterias.



## Tratamiento térmico para validación de la Selectividad



## Filtración de membrana de la muestra con Millipore®



## Tratamiento con Lisozima (35 mg/ml)



Incubación a 37°C para evaluación de fosfatasa alcalina



Comparación con NMP para validación de la Exactitud

