

**EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA BacT/ALERT 3D
PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES EN
PRODUCTOS LÁCTEOS UHT CON FINES DE VALIDACIÓN E
IMPLEMENTACIÓN EN UNA PLANTA LÁCTEA DE
CUNDINAMARCA/COLOMBIA**

MANTILLA DIAZ NAYSHA YURANY
COD: 1098809800

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
Pamplona, Colombia
2023

**EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA BacT/ALERT 3D PARA
LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES EN
ALIMENTOS LÁCTEOS UHT CON FINES DE VALIDACIÓN E
IMPLEMENTACIÓN EN UNA PLANTA LÁCTEA DE
CUNDINAMARCA/COLOMBIA**

MANTILLA DIAZ NAYSHA YURANY

Informe de grado presentado como requisito para optar el título de:
Microbióloga

Tutor

ENRIQUE ALFONSO CABEZA HERRERA
Docente investigador, programa microbiología

Jefe directo

FABIO ALFONSO MENDOZA PRETELT
Coordinador de Aseguramiento de Calidad e Inocuidad Nacional

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA**

Pamplona, Colombia

2023

Nota de Aceptación

Firma jurado

Firma jurado

Pamplona, ____ de _____ 2023



Dedico este trabajo a Dios, mi familia y amigos que día a día acompañan mis pasos con amor, paciencia y fe en mí. A aquellos que no tuvieron dudas de que podría lograrlo y a los que sí, porque me impulsaron a seguir; a los que apoyaron cada uno de mis sueños, deseos y ocurrencias por más descabellados que parecieran. También a mis compañeros y profesores que con dedicación me corrigieron, con deber me enseñaron y en un punto del camino fueron más que solo una instrucción a seguir.

Las palabras son escasas, pero dedico mi trabajo a todos los que vieron mis lágrimas, ojeras e inseguridades y tomaron un lugar a mi lado para no dejarme caer y enderezar mis pasos.

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente agradezco a Dios por darme todo. Desde el aire hasta el soporte económico y las muchas oportunidades día a día. Le agradezco haber sido mi mejor amigo y compañero en el camino; mi paño de lágrimas y café por las noches; el abrazo en la soledad y el calor en los días más fríos. Agradezco que no se rinda conmigo y me muestre con detalles que soy mejor de lo que me puedo imaginar y que con el de mi lado todo lo puedo lograr.

También agradezco a mis padres *Luz Marina Diaz* y *Edgar Mantilla* por ser la motivación para siempre ir un poco más allá. Por confiar en mí, amarme y ofrecerme la oportunidad de alcanzar mis sueños. Por mi soporte, por el esfuerzo inimaginable que solo ellos pudieron hacer y por hacerme sentir la mejor aun cuando ni yo lo creía. A mis hermanos *Camilo* y *Santiago* por decirme “Hágale” cuando llegaban días difíciles y acompañar a mis padres en el proceso. A mi hermana *Yury Villamizar* porque, aunque no tenemos la misma sangre, me cuidó, acompañó y soportó en los momentos más críticos y vulnerables de manera desinteresada y sincera. Y a mi familia en general por su apoyo y confianza.

A mi novio *Andrés Chona* por ser fortaleza, compañía, atención, apoyo y dedicación cuando era justo lo que necesitaba; por comprender altibajos y cuidarme en los días malos sin reproches. Mis compañeros y amigos *Sarima*, *Adrián*, *Sara*, *Diego*, *Felipe*, *Martha* y *Sebastián* quienes acompañaron mi proceso mano a mano creciendo y experimentando las buenas y malas; que con sus ejemplos me dieron grandes lecciones de vida, superación y berraquera que serán inolvidables.

Agradezco en gran manera al grupo docente que me formó no solo en presaberes, sino en valores y principios que forjaron en mí un espíritu humano y tenaz con visión y hambre de conocimiento. A la docente *Wlida Margarita Becerra* por ser digna de admirar en mi carrera universitaria, una gran amiga personal y un pilar irrevocable en mi crecimiento. Por ir siempre más allá de la hora y las aulas para dar su instrucción, calidez y apoyo; por creer en mí y en mis capacidades brindando oportunidades de superación y desafío; por sus oraciones y pedidos que Dios siempre contestó.

Agradezco a mi tutor *Enrique* por estar a la vanguardia de mi estadía como pasante y por aclarar mis dudas para hacer un excelente trabajo. A la familia empresarial por su acogida y confianza; a mis líderes *Fabio Mendoza* y en especial *Camilo Pedroche* por guiarme e instruirme muy de cerca en la etapa que culminó con este trabajo, por ser un retraso de lo que quiero y no quiero ser; a mis compañeros *Marcela*, *Cristina*, *Claudia Miguel*, *Leyder* y *Natalia* por tener la mejor actitud y disposición para enseñarme y corregirme en el trabajo directo.

Para finalizar, agradezco a la Universidad de Pamplona y todo lo contenido en ella por brindarme años de experiencia, aprendizaje y superación.



Contenido

1. INTRODUCCIÓN	16
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
3.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	21
3.2 JUSTIFICACIÓN.....	21
4. MARCO CONCEPTUAL	24
4.1 ANTECEDENTES	24
4.2 TEÓRICO	26
4.2.1 Generalidades de la leche.....	26
4.2.2 Definiciones relacionadas.	28
4.2.3 Microorganismos asociados	30
4.2.4 Pasteurización y esterilidad comercial de la leche UHT	31
4.2.5 Identificación y caracterización de contaminantes microbiológicos	32
4.3 LEGAL	37
4.3.1 DECRETO 616 DEL 2006.....	37
4.3.2 RESOLUCIÓN 2115 DEL 2007	37
4.3.3 RESOLUCIÓN 2674 DE 2013.....	37
4.3.4 RESOLUCIÓN 2310 DE 1986.....	38
4.3.5 NORMA TÉCNICA COLOMBIANA-ISO 22000 DEL 2005	38
4.3.6 RESOLUCIÓN 1407 DE 2022.....	38
4.3.7 RESOLUCIÓN 2195 DE 2010.....	39
4.3.8 NORMA TÉCNICA ANDINA PNA 16 007:2007	39
4.3.9 NORMA TÉCNICA ANDINA PNA 16 006:2007	39
4.3.10 NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 1419 DE 2004	39
4.3.11 NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 4433 DE 2006	40
4.3.12 NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 930 DE 2008	40
5. MÉTODOS	41

5.1 AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS	41
5.1.1 Pseudomonas spp.....	41
5.1.2 Enterobacteria.....	42
5.1.3 Staphylococcus spp.....	43
5.1.4 Bacillus spp	43
5.2 VISTA GENERAL DEL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA	44
5.2.1 Inoculación de las botellas	44
5.2.3 Ingreso de las botellas inoculadas al equipo.....	45
5.2.4 Extracción de muestra de botellas inoculadas para confirmación	46
5.3 PRUEBA DE PRESENCIA.....	48
5.3.1 Primer ciclo de PRUEBA PRESENCIA.....	48
5.3.2 Segundo ciclo de PRUEBA PRESENCIA.....	48
5.3.3 Tercer ciclo de PRUEBA PRESENCIA	48
5.4 PRUEBA DE COMPATIBILIDAD.....	49
5.4.1 Evaluación para cada lote.....	49
5.5 PRUEBA CATASTRÓFICA FASE I	50
5.5.1 Descripción	50
5.5.2 Fases 1, 2 y 3.....	50
5.6 PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II.....	51
5.6.1 Preparación de los inóculos de las cepas aisladas anteriormente	51
5.6.2 Diluciones y estandarización de cada microorganismo	52
5.6.3 Inoculación de las muestras con los agentes contaminantes	53
5.6.4 Aplicación de la prueba.....	53
6. CRONOGRAMA.....	55
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
7.1 AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS	57
7.1.1 Pseudomonas aeruginosa	57
7.1.2 Enterobacter cloacae	57
7.1.3 Staphylococcus spp.....	57
7.1.4 Bacillus cereus.....	57
7.2 FUNDAMENTO DE LA DISCUSIÓN	57
7.3 PRUEBA DE PRESENCIA.....	58

7.3.1 Resultados Primer ciclo PRUEBA DE PRESENCIA.....	59
7.3.2 Resultados ciclo 2 y 3 PRUEBA DE PRESENCIA.	60
7.4 PRUEBA DE COMPATIBILIDAD.....	61
7.5 PRUEBA CATASTRÓFICA FASE I.	64
7.5.1 Primer ciclo de producción	65
7.5.2 Segundo ciclo de producción.....	66
7.5.3 Tercer ciclo de producción.....	68
7.6 PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II.....	70
7.6.1 Estandarización de concentración de cepas.....	70
7.6.3 Análisis de la prueba CATASTRÓFICA FASE II.	71
7.7. Estudios relacionados con el sistema BacT/Alert 3D	76
7.8 Complemento	77
8. CONCLUSIONES	78
9. RECOMENDACIONES	79
10. REFERENCIAS.....	80
11. ANEXOS	88

LISTADO DE IMÁGENES

Imagen 1. Comportamiento brotes de ETA, Periodo epidemiológico III, Colombia 2019.	26
Imagen 2. Milliflex® Quantum	34
Imagen 3. Sistema BacT/ALERT 3D.....	34
Imagen 4. Botellas iFA Plus, BacT/ALERT 3D.....	35
Imagen 5. Principio funcionamiento BacT/ALERT 3D.....	36
Imagen 6. Composición agar Cetrimide.....	41
Imagen 7. Composición medio VRB.	42
Imagen 8. Composición medio selectivo para B. cereus	43
Imagen 9. Composición medio PC.....	43

LISTADO DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Síntesis de los componentes de la leche.	27
Diagrama 2. Síntesis de la lactosa.....	28
Diagrama 3. Inoculación de botellas iFA PLUS	45
Diagrama 4. Ingreso de botellas al sistema	46
Diagrama 5. Extracción de muestra de botellas inoculadas para confirmación.....	47
Diagrama 6. Flujo de trabajo prueba de Presencia.....	49
Diagrama 7. Flujo de trabajo prueba compatibilidad.	50
Diagrama 8. Flujo de trabajo prueba catastrófica fase I.	51
Diagrama 9. Preparación de inóculo.	52
Diagrama 10. Diluciones y estandarización.	52
Diagrama 11. Flujograma prueba catastrófica fase II.	53
Diagrama 12. Detección de BETNA por el sistema BacT/ALERT 3D en muestras preincubadas. .	61
Diagrama 13. Matrices evaluadas.	62

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Proporción de alimentos causantes de brotes en Colombia del año 2000 al 2019.	25
Tabla 2. Resultados PRUEBA PRESENCIA.	59
Tabla 3. Resultados PRUEBA COMPATIBILIDAD.	62
Tabla 4. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE I, ciclo 1.	65
Tabla 5. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE I, ciclo 2.	67
Tabla 6. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE I, ciclo 3.	68
Tabla 9. Relación UFCs inoculadas detección por el sistema.	72
Tabla 10. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II, <i>B. cereus</i>	73
Tabla 11. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II, <i>P. aeruginosa</i>	74
Tabla 12. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II. <i>E. cloacae</i>	75
Tabla 13. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II, <i>Staphylococcus</i> spp.	75

Tabla 14. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II, Control de bolsas..... 76

LISTADO DE FÓRMULAS

Fórmula 1. Informar una sola dilución con 3 placas..... 52
Fórmula 2. Promedio..... 70
Formula 3. UFCs presentes en el análisis (aproximado)..... 73



GLOSARIO

Inocuidad: Acción o actividad que se puede usar para prevenir o eliminar un peligro relacionado con la inocuidad de los alimentos o para reducirlo a un nivel aceptable. (NTC-ISO 22000)

Punto de control crítico (PCC): Paso en el cual se puede aplicar un control esencial para prevenir o eliminar un peligro relacionado con la inocuidad de los alimentos. (NTC-ISO 22000)

Verificación: Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos especificados. (NTC-ISO 22000)

Cadena alimentaria: Secuencia de las etapas y operaciones involucradas en la producción, procesamiento, distribución, almacenamiento y manipulación de un alimento y sus ingredientes, desde su producción primaria hasta consumo. (NTC-ISO 22000)

Ultra-alta-temperatura (UHT): Proceso térmico de flujo continuo aplicando una temperatura entre 135°C a 150°C y tiempos de entre 2 y 4 segundos de tal manera que se compruebe la destrucción eficaz de las esporas bacterianas resistentes al calor seguido de enfriamiento a temperatura ambiente y envasado aséptico en recipientes estériles con barreras de luz y oxígeno cerrados herméticamente para su posterior almacenamiento, con el fin de que se asegure la esterilidad comercial sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas y organolépticas, la cual puede ser comercializada a temperatura ambiente. (Decreto 616, 2006)

Esterilidad comercial: Estado que se consigue aplicando calor suficiente, sólo o en combinación con otros tratamientos apropiados, con el objeto de liberar a ese alimento de microorganismos patógenos y de otros microorganismos capaces de reproducirse en él en unas condiciones normales no refrigeradas en las que se mantendrá probablemente el alimento durante su distribución y almacenamiento. (NTC-4433, 2006)

Buenas prácticas de Laboratorio (BPL): Conjunto de reglas y procedimientos operativos que garantizan que los datos generados son reproducibles y representativos, asegurando así la validez y confiabilidad de los resultados al ofrecer productos seguros e inocuos al consumidor. (Resolución 3619, 2013)

HHRS: Grupo heterogéneo de especies de microorganismos del género *Bacillus* que como característica principal tienen la formación de esporas con alta hidrofobicidad y altamente resistente a los procesos de Ultra Alta Temperatura. (Luna, 2014)

Control de calidad: Son todas las medidas tomadas incluyendo el establecimiento de especificaciones de muestreo, análisis e informe de análisis, para asegurar que las materias primas, productos intermedios, materiales de envase y productos terminados cumplan con las especificaciones establecidas para identidad, contenido, pureza y otras características. (Resolución 3619, 2013)

BacT/Alert 3D: Sistema automático que incuba, agita y monitoriza los frascos de muestras para detectar el crecimiento microbiano. (BIOMERIEUX, 2012)

Envase sellado herméticamente: Diseñado con el propósito de evitar en forma segura, la entrada de microorganismos y mantener la esterilidad comercial de su contenido después del procesamiento. (Resolución 2195, 2010)

pH: Indicador de la acidez de una sustancia que está determinado por el número de iones libres de hidrógeno (H⁺) en una sustancia. (Resolución 2195, 2010)

RESUMEN

La industria láctea en todo su recorrido hasta el día de hoy ha enfrentado desafíos en la identificación de microorganismos contaminantes en sus productos. Debido a la alta demanda de alimentos lácteos en la actualidad, la optimización de los procesos de producción, análisis físico químico, microbiológico y liberación de productos es fundamental para garantizar la estabilidad y sostenibilidad de una planta productora; además la mejora continua en la calidad ofrecida al mercado no sólo fideliza el consumidor sino también hace de la inocuidad la herramienta número uno del éxito y cuidado en la salud pública.

Dentro de los avances biotecnológicos relacionados con esta industria encontramos los productos UHT o tratados con Ultra Alta Temperatura que prometen alimentos libres de contaminantes microbianos en especial de origen patógeno sin alterar las características nutricionales de este y permitiendo su comercialización a temperatura ambiente ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$). Para hacer seguimiento de la efectividad de estos procesos se plantearon protocolos de garantías de esterilidad comercial que constan de análisis microbiológicos y fisicoquímicos en ciertos periodos de tiempo después del envasado de los productos UHT con el fin de prevenir contaminación microbiana por fallas en la terminación. Los microorganismos contaminantes pueden tardar días en ser detectados mediante los análisis microbiológicos tradicionales de esterilidad y se corre el riesgo de que sean liberados al mercado provocando un foco masivo de intoxicación alimentaria. Por lo anterior, empresas multinacionales comprometidas con garantizar la seguridad de los alimentos como BIOMERIEUX han desarrollado sistemas de detección rápida de microorganismos contaminantes en productos UHT por emisión de una alerta temprana para el diagnóstico y detección de la pérdida de esterilidad comercial en el menor tiempo posible evitando millonarias pérdidas por reclamos y bajas de productos, entre otros.

BacT/Alert 3D comercializado por la multinacional ya mencionada, es un sistema cuya función principal es captar el aumento de CO_2 en matrices lácteas UHT resultado del metabolismo microbiano contaminante en menos de 24 horas; el sistema ofrece alta sensibilidad en la captación del gas y la emisión de una ALERTA TEMPRANA cuando los resultados son positivos.

Se realizó una verificación de la eficiencia del sistema BacT/Alert 3D en una planta láctea de Cundinamarca, Colombia en donde se evidencio que el equipo cumple satisfactoriamente con los objetivos planteados y puede ser implementado dentro del análisis rutinario para detección de pérdida de esterilidad.

Palabras clave: BacT/ALERT 3D, contaminación microbiana, esterilidad comercial, inocuidad, iFA Plus, leche UHT.

ABSTRACT

Throughout its history, the dairy industry has faced challenges in the identification of contaminating microorganisms in its products. Due to the high demand for dairy foods today, the optimization of production processes, physical, chemical and microbiological analysis and product release is essential to ensure the stability and sustainability of a production plant; in addition, continuous improvement in the quality offered to the market not only builds consumer loyalty but also makes safety the number one tool for success and public health care.

Among the biotechnological advances related to this industry we find the UHT or Ultra High Temperature treated products that promise food free of microbial contaminants, especially of pathogenic origin, without altering its nutritional characteristics and allowing its commercialization at room temperature (23° C +/-1). In order to follow up the effectiveness of these processes, protocols of commercial sterility guarantees were proposed, consisting of microbiological and physicochemical analyses in certain periods of time after the packaging of UHT products in order to prevent microbial contamination due to failures in the thermization process. Contaminating microorganisms can take days to be detected by traditional microbiological sterility tests and risk being released into the market causing a massive outbreak of food poisoning. Therefore, multinational companies committed to ensure food safety as BIOMERIEUX have developed rapid detection systems for contaminating microorganisms in UHT products by issuing an early warning for the diagnosis and detection of the loss of commercial sterility in the shortest possible time avoiding millions of dollars in losses due to claims and cancellations of products, among others.

BacT/Alert 3D, marketed by the aforementioned multinational company, is a system whose main function is to capture the increase of CO₂ in UHT milk matrices resulting from contaminating microbial metabolism in less than 24 hours; the system offers high sensitivity in capturing the gas and issuing an EARLY ALERT when the results are positive.

A verification of the efficiency of the BacT/Alert 3D system was performed in a dairy plant in Cundinamarca, Colombia where it was evidenced that the equipment satisfactorily fulfills the proposed objectives and can be implemented within the routine analysis for the detection of sterility loss.

Key words: Commercial sterility, BacT/ALERT 3D, iFA Plus, microbial contamination, safety, UHT milk.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la industria láctea representa uno de los recursos con mayor eficiencia en la generación de alimentos nutritivos, asequibles y con amplia variedad de opciones para su consumo. Desde la aparición de pequeñas civilizaciones, la ganadería y el uso de algunos animales mamíferos para la extracción y aprovechamiento de la secreción mamaria con innumerables beneficios fue y hasta el día de hoy es un complemento básico en la alimentación humana. La industria láctea abarca un 27% en la ganadería mundial y un 10% en agricultura cuya producción evaluada en 2013 representó 328 millones de dólares aproximadamente, ocupando el tercer lugar en cuanto a beneficio y obteniendo el título al producto de más valor a nivel global (FAO, 2013).

La leche es un producto de consumo mundial con matrices heterogéneas de suministro como la oveja, cabra, camello (4%), búfalo (15%), y vaca (81%), siendo ésta última la de mayor comercialización y consumo. La distribución y propiedad de animales lecheros es de amplio rango a nivel de agricultura y su posesión representa activos inmediatos y a corto plazo para los ganaderos y sus familias (FAO, 2013). El consumo de productos lácteos ha aumentado de manera exponencial en las últimas décadas y se estima que seguirá creciendo un 1.6% anualmente hasta el año 2025; India considerado el país mayor productor de leche en el mundo, incrementó un 4.2%, sin embargo, tal incremento no dio mayor afectación a los trabajadores en la comercialización de derivados a nivel mundial como Nueva Zelanda, Unión Europea y Estados Unidos de América. China líder en exportación de productos lácteos aumentó la producción un 3.6% en 2019 debido al incremento en el consumo (FAO, 2020).

En América Latina la actividad láctea representa el sostenimiento de gran parte del territorio junto al desarrollo y distribución de derivados lácteos; aporta al crecimiento cultural de muchos productores y millones de emprendedores participando en un 12% de la producción de leche bovina, un 13% en importaciones y 7% en exportaciones de productos lácteos a nivel mundial. Gracias a su amplia y versátil adaptación, abarca muchas otras actividades industriales en las que se fomenta la creación de empleo en especial acogida a jóvenes y mujeres desde las labores pecuarias en finca hasta la distribución y venta de sus productos. A diario más de 3,3 millones de productores se apropian de esta actividad para suplir la demanda de 81 millones de toneladas de leche anuales de los cuales el 81% se generan por sistemas especializados. Argentina, Uruguay y Chile son los países con producción significativa de Sudamérica, pero no logran competir con Austria, Nueva Zelanda y Estados Unidos quienes alcanzan hasta un 90% de volumen de producción sobre los países latinoamericanos (Acosta y Galet, 2022).

En Colombia la producción de leche se reporta en 1.104 municipios del país (Consejo Nacional de Acreditación, (CNA, 2014), siendo un foco de bajas barreras de acceso en su comercialización y de gran atractivo para los ciudadanos quienes hacen de esta industria las bases económicas de sus familias. La diversidad de venta de leche en las regiones, muestra lugares con capacidad de producción en el mercado muy alta y otros con baja, pero con altos niveles de competitividad en cuanto a calidad e inocuidad. El incremento en la comercialización de leche en Colombia no solo se debe al producto líquido neto sino también al alza en consumo de productos sólidos derivados como quesos y cuajadas especialmente en el año 2013 al 2018; adicionalmente el gobierno Colombiano ha apoyado a los ganaderos y principales productores de leche que alcanzan estándares de almacén de 74 ton y 1.268 ton de quesos y leche respectivamente, con un incentivo de 301 millones de pesos en el departamento de Cauca y Nariño; sin embargo los aportes gubernamentales sólo abarcan una pequeña población productora. Nacionalmente la comercialización de lácteos tiene una fuerza competitiva con países latinoamericanos pero la capitalización en países potenciales no ha sido eficiente debido al alto valor de producción, calidad, y seguridad alimentaria (Unidad de Planificación Rural Agropecuaria, 2020).

La matriz láctea en especial la bovina aporta una alta cantidad de nutrientes, carbohidratos, minerales, vitaminas, aminoácidos y proteínas en la alimentación de mamíferos. La leche contiene dos grupos de proteínas con propiedades individuales que proporcionan condiciones adecuadas para el desarrollo de casi cualquier microorganismo; las llamadas proteínas fosfóricas que están compuestas mayormente por caseína y las WPs (proteínas del suero). Además, cada una de estas proteínas están formadas por subunidades según su especie y las variaciones que puedan presentar dan origen a nuevas características fisicoquímicas y organolépticas (Davor, 2022). El llamado “alimento perfecto” por su completo complejo nutricional además de ser rico y apetecido por mamíferos de diferentes especies es también la matriz perfecta para el desarrollo y crecimiento de muchas especies microbianas que pueden o no tener afectaciones directas sobre las características físicas y químicas del producto, y a su vez ocasionar infección y enfermedades gastrointestinales en humanos.

Entre la microbiota común de la leche que hasta el día de hoy no ha generado alteraciones significativas en el proceso de comercialización ni afectaciones a la salud pública encontramos *Micrococcus*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp* y *Corynebacterium spp* que pueden ser transmitidas a la leche por la mala manipulación en el proceso de ordeño o suciedad relacionada con las malas prácticas pecuarias (Erkmen, 2022). Las bacterias lácticas (*Lactococcus spp*, *Streptococcus spp*, *bifidobacterium spp*, *Lactobacillus* entre otros) tienen un metabolismo activo respecto al carbohidrato de mayor importancia en la leche, la lactosa y como producto de ese metabolismo la formación de ácido láctico que contribuye a la alteración (fermentación) de la misma y los sólidos derivados (López y Barriga, 2016).

Otro de los microorganismos descubiertos recientemente como habitante cotidiano de la leche es un bacilo esporulado no alterante que resiste altas temperaturas y procesos de ultra pasteurización y es adquirido en los piensos y alimentos proporcionados a los animales lecheros. Pese a que no hay reporte de que este microorganismo interfiera directamente en la alteración de la leche, la formación de biopelículas que genera puede albergar patógenos de mayor interés para la calidad y seguridad del producto como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva y *Bacillus cereus* que tiene la capacidad de formar esporas termorresistentes sobrevivientes a los procesos de ultrapasteurización (UHT) y pueden causar lo anteriormente mencionado aún en productos sometidos a éste proceso (Pereira, 2022).

En cuanto a las bacterias alterantes como *Pseudomonas fluorescens* que es psicotrofa (se puede desarrollar a bajas temperaturas) y genera alteraciones de textura, color, olor y sabor en la leche ocasiona pérdidas de calidad con carácter millonario en la industria. Los coliformes es la denominación dada a un grupo de microorganismos hetero fermentadores que degradan la lactosa a ácido láctico y dióxido de carbono produciendo la alteración indeseada de la leche a un sabor desagradable, ácido y viscosa con pérdida del flavor; la contaminación de los productos lácteos con las bacterias de este grupo se le atribuye a la deficiencia en las prácticas higiénico sanitarias empleadas por los manipuladores y su desarrollo se da por perdida de cadena de frío o ineficiencia en la pasteurización. Para referirnos a bacterias alterantes se debe tener en cuenta el producto de interés, por ejemplo, las bacterias lácticas mencionadas anteriormente, son una pieza clave en la elaboración del yogurt y productos fermentados mientras que en las matrices sin fermentar son vistas como un riesgo de alteración para la calidad del producto (López y Barriga, 2016).

Es importante recalcar que como complemento a los nutrientes que ofrece la leche para el desarrollo microbiano está la temperatura, pH, oxígeno y disponibilidad de agua según las necesidades del microorganismo que se desarrolle. Estas condiciones controladas pueden favorecer o prevenir la alteración y contaminación de productos por microorganismos alterantes o patógenos. Gran variedad de estos microorganismos también posee la cualidad patogénica por efecto de su metabolismo y otros factores; evitar los microorganismos con esta característica es de vital importancia para garantizar la salud pública en la comercialización del producto. Entre los patógenos comunes en productos lácteos encontramos *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus coagulasa positivo*, *Brucella spp*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes (en quesos)* y *Cronobacter spp*. para los que se establece reglamentación y normativa de control y representan peligro potencial para la seguridad en salud pública (López y Barriga, 2016).

La presencia de microorganismos patógenos en alimentos que causan infección e intoxicación (propia o toxigénica) en consumidores, encienden las alarmas en los organismos de control de inocuidad como el CDC (Centro Para El Control y Prevención De Enfermedades) que se encargan de monitorear las alertas de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAS) para tomar medidas y restablecer la salud. (Autora)

Los microorganismos patógenos que amenazan la salud pública en los productos lácteos son una responsabilidad directa de la empresa comercializadora, las enfermedades consecuencia de contaminación son ocasionadas por inadecuadas prácticas en las plantas de procesamiento y comercialización del alimento desde que se obtienen las materias primas para su elaboración. Para la verificación de calidad e inocuidad, las entidades reguladoras colombianas como el Instituto Colombiano agropecuario (ICA), el Ministerio de Salud y Protección Social (MSPS) y el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), establecen normativa de obligatorio cumplimiento y recomendación para facilitar a la industria las garantías de sanidad e inocuidad (MINISTERIO DE SALUD, 2017).

La detección y control de contaminantes microbianos en la industria lechera comprende un conjunto de técnicas de muestreo y análisis con métodos tradicionales que siguen el auge de la innovación. La microbiología tradicional es empleada en las grandes industrias para respaldar la veracidad de resultados a bajo costo; se fundamenta en el análisis fenotípico de las características observables de los microorganismos como su morfología y capacidades bioquímicas. Comúnmente, los análisis en medios de cultivo selectivos y diferenciales son la mejor elección que en combinación con el consumo de oxígeno, temperatura de incubación, agua disponible, entre otras variables, sustentan herramientas de aislamiento confiables. En ella se emplean técnicas de microscopía, atmósferas modificadas, pruebas bioquímicas como acción de la enzima catalasa y oxidasa, fermentación de azúcares y movilidad. Al combinar distintas técnicas mencionadas anteriormente se logra la identificación presuntiva de una especie microbiana que pueden evitar el gasto en pruebas moleculares. (Olmos, García y colaboradores, 2010).

Con los avances biotecnológicos el área microbiológica se ha visto muy beneficiada. Los procesos que tardaban días y semanas se pueden realizar al día de hoy en solo horas gracias a las nuevas herramientas automatizadas. El sistema BacT/ALERT 3D ofrece la alternativa perfecta para la detección temprana de contaminación microbiológica bajo su sistema de captación de CO₂ siendo una herramienta eficiente en los protocolos de esterilidad comercial de productos Ultra Alta Temperatura.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el funcionamiento del sistema BacT/ALERT 3D en la alerta temprana de contaminación microbiana diferentes a bacilos esporulados termorresistentes no alterantes (BETNA) en alimentos lácteos UHT con fines de validación e implementación en una planta de Bogotá, Cundinamarca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Aislar** mediante microbiología tradicional 4 diferentes cepas de microorganismos contaminantes presentes en la planta para posteriormente ser enfrentados al sistema BacT/ALERT 3D
- Caracterizar en el funcionamiento del sistema BacT/ALERT 3D **la presencia** de BETNA habitante común en leche UHT con fines de prevenir falsas alertas.
- Determinar mediante prueba de **compatibilidad** los posibles interferentes asociados a las características de matrices lácteas UHT evaluadas con el sistema BacT/ALERT 3D que puedan llevar a la generación de falsos positivos.
- Cualificar los **efectos** sobre el análisis en el sistema BacT/ALERT 3D de líneas largas de producción incluyendo inicios, intermedio y finales saturando el sistema bajo la prueba llamada **catastrófica I**.
- Demostrar la **efectividad y sensibilidad** del sistema evaluado en la detección de contaminantes microbianos en leche entera UHT diferentes a bacilos esporulados termorresistentes no alterantes en un tiempo menor o igual a las 24 horas. Etapa llamada “**catastrófica II**”.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Las fallas de esterilidad en las plantas de procesamiento lácteo generan pérdidas económicas millonarias y pone en riesgo la salud pública; microorganismos versátiles y adaptables pueden sobrepasar las barreras de inocuidad en momentos oportunos de la producción y salir al mercado sin ser detectados. Los métodos tradicionales de análisis microbiológico tardan días en el diagnóstico efectivo de contaminación en las pérdidas de esterilidad, los productos en cuartos de cuarentena pueden tomar hasta 10 días en evidenciarse cambios organolépticos que alerten una contaminación; durante ese tiempo el producto ya a sido comercializado y es foco potencial de un problema de salud pública.

3.2 JUSTIFICACIÓN

La ingestión de alimentos contaminados con agentes tóxicos e infecciosos de origen microbiano son causantes de enfermedades gastrointestinales, meningitis, abortos, sepsis, síndrome de Guillan Barré y en los más desafortunados, la muerte. Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAS) tienen mayor incidencia en población inmunocomprometida, mujeres embarazadas y niños; también impactan el sector socioeconómico recargando los sistemas de salud y ocasionando pérdidas millonarias a las industrias que se ven implicadas. El manejo, detección y control de los agentes causantes de estas contaminaciones es primordial para disminuir pérdidas económicas y de producción garantizando a su vez la salud pública. (Soto; Pérez y Estrada, 2016).

La contaminación en una matriz tan nutritiva y llamativa para microorganismos de amplia variedad como la leche, requiere de constante y rigurosa inspección que garantice la calidad e inocuidad del producto durante su tiempo de utilidad. Para alargar la vida útil de algunos productos lácteos se implementó en la industria los sistemas UAT/UHT (Ultra Alta Temperatura) que ofrecen productos al mercado con garantías más específicas y ambiciosas en la eliminación de agentes contaminantes sin afectar la composición nutricional de los alimentos. Un producto UAT/UHT es concebido como el alimento que no debe presentar recuentos microbiológicos después de 10 a 14 días de incubación a 35°C y 55°C (RESOLUCIÓN 1407, 2022); los análisis que requiere este tipo de alimentos son un reto para la microbiología tradicional ya que se dispone de poco tiempo para la liberación del producto. Los productos que serán liberados al mercado deben cumplir periodos de espera dentro de la planta para su comercialización hasta la porción de certificados de calidad

por el área fisicoquímica y microbiológica; estos últimos toman largo tiempo de análisis que retrasa la línea de producción.

Cuando un producto es liberado y comercializado fuera de la planta sin certificados confiables, llega al consumidor con incertidumbre de su calidad ya que no cuenta con los resultados microbiológicos de cumplimiento en donde se verifica la ausencia de contaminaciones o proliferaciones de microorganismos detectados a tiempo. Los riesgos en la comercialización de productos contaminados provocan año tras año demandas, de fidelización del cliente, pérdidas económicas invaluable, riesgo en la salud pública, brotes y posibles muertes. La pérdida de esterilidad en las líneas de producción se da cuando falla el monitoreo de un punto crítico de control (momento y lugar del proceso en el que se debe aplicar estricto control para garantizar la inocuidad de un alimento) o no se ha tenido en cuenta; estas fallas abren paso a la contaminación en el proceso con agentes causantes de enfermedad o deterioro al producto. Detectar estas pérdidas de esterilidad en un tiempo mínimo o récord ahorraría mucho dinero en activos, disponibilidad de inventarios, productos comercializables y evitaría la pérdida de clientes por reclamos. (Ramos y colaboradores, 2021)

Por lo anterior, las entidades comprometidas con innovar y generar alertas tempranas en la detección de contaminantes microbianos no solo en la industria láctea y médica, desarrollan cada año herramientas funcionales y disponibles para las industrias que evitan liberar productos al mercado que generen riesgo. El sistema **BacT/ALERT 3D** desarrollado por la compañía multinacional francesa **BIOMERIEUX** es una de esas alternativas que da resultados confiables en un tiempo igual o menor a las 24 horas. Este sistema monitorea el crecimiento microbiano según la activación del metabolismo y sus picos detectables. La producción de CO₂ es el fundamento de alerta del sistema por ser un metabolito principal en muchos microorganismos; en la atmósfera controlada ofrecida por las botellas iFA plus se encuentra un indicador de acidificación del medio que al virar (cambiar de color) aumenta su reflectancia siendo captada por un fotodiodo en unidad de reflectancia (UR), emitiendo una alerta de contaminación visual y sonora para el operador.

La inclusión de este sistema en la industria brinda detección de manera rápida y eficiente en pérdidas de esterilidad evitando la liberación de alimentos al mercado que sobrepasen los límites microbiológicos de aceptabilidad normativa y alertando eficientemente para el control de la contaminación. Para implementar un nuevo sistema como **BacT/ALERT 3D** en los protocolos rutinarios de una planta de producción es necesario evaluar su eficiencia seguido de una rigurosa validación con la normativa y métodos rutinarios, para dar finalidad con planes de implementación; para ello se presenta este documento como resultado de una verificación de funcionamiento del equipo con énfasis en posterior validación e

implementación que corresponde a la empresa proveedora junto a los profesionales de la plana.



4. MARCO CONCEPTUAL

4.1 ANTECEDENTES

Los alimentos de origen lácteo en Colombia representan un pilar para la sostenibilidad de miles de familias; por ello preservar la salud en su consumo es el principal foco de atención de esta industria. El consumo de lácteos en Colombia cada día trasciende fronteras de poco acceso y clases socioeconómicas, es responsabilidad de cada empresa proveedora regirse rigurosamente a los estándares normativos nacionales previniendo la contaminación de una matriz tan apetecida.

Las propiedades fisicoquímicas de la leche ofrecen condiciones favorables para el desarrollo de muchos patógenos ya sean zoonóticos como *Listeria monocytogenes*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus aureus* causante de mastitis, entre otros que pueden contaminar la leche al momento del ordeño y ser eliminados posteriormente bajo procesos de pasteurización. En el recorrido que hace la leche para llegar a las plantas de tratamiento se ve en riesgo la contaminación con patógenos muy comunes en alimentos como *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter jejuni* quienes son responsables por brotes de intoxicaciones e infecciones alimentarias más comunes. (Ponce de León, 2007).

La ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS) en 2015 reportó que aproximadamente 1 de cada 10 personas ha sufrido enfermedad por alimentos contaminados causando la muerte a aproximadamente 420.000 personas con niños entre ellos. Los continentes con más mortalidad por enfermedades alimentarias son África y Asia Sudoriental afectando en su mayoría infantes, mujeres en embarazo, adultos mayores y personas con insuficiencia inmunitaria. (OMS, 2015)

Algunos de los muchos reportes de brotes ocasionados por el consumo de leche líquida cruda o pasteurizada incluyen a niños como es el caso de 11 niños del estado de California que en junio de 2009 reportaron infección con *E.coli O157:H7* después del consumo de masa cruda para galletas; 3 de ellos presentaron el SÍNDROME UREMICO HEMOLÍTICO (SUH) característico de esta cepa. (CDC, 2009). En el mismo periodo se reportó intoxicación por consumo de leche en una escuela de Wisconsin que no solo afectó a niños sino también a adultos con sintomatología de calambres abdominales, náuseas, diarrea; finalmente se detectó como agente causante al patógeno *Campylobacter*. Según el CDC de 2007 a 2012 se reportaron más de 162 casos asociados a infección alimentaria por consumo de leche de los cuales 12 fueron hospitalizaciones y ninguna muerte (Mungai, EA, Behraves, C. y Gould, L. 2015).

En 2014 el CDC reportó un brote de campilobacteriosis por consumo de leche, con 59 casos confirmados, 10 hospitalizaciones y una muerte. Lo peculiar de este caso es que aunque los recuentos microbiológicos rutinarios se encontraban dentro según los parámetros el agente causal *Campylobacter jejuni* seguía representando un peligro inherente. (Davis KR, Dunn AC, Burnett C, 2014) En este mismo año se reportó brote multiestatal en EE.UU de listeriosis vinculado a productos lácteos de Roos Foods dejando en total ocho personas infectadas con *Listeria monocytogenes* en California y Maryland con una muerte y 7 hospitalizaciones. Tras una investigación colaborativa del CDC y la FDA (Administración de Drogas y Alimentos) indicó que el brote fue ocasionado por productos lácteos distribuidos por la Roos Foods y fueron retirados de manera inmediata del mercado. (CDC, 2015). Para febrero del 2021 un brote de *Listeria monocytogenes* en New York, Virginia, Maryland y Connecticut EE. UU fue reportado vinculado a queso fresco fabricado por El Abuelito Cheese Inc; el brote provocó un total de 13 casos de enfermedad, 12 hospitalizaciones y una muerte. El producto fue retirado del mercado el 17 de febrero del mismo año. (CDC, 2021).

América tiene el segundo lugar en incidencia por enfermedades transmitidas por los alimentos de manera minimalista con un estimado anual de 9000 muertes cada año de las cuales 2000 son niños; los agentes causales más comunes son *Norovirus*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* y *Salmonella no tifoidea*. (OMS, 2015)

En Colombia las enfermedades transmitidas por los alimentos se han notificado por el consumo de diversidad de productos mencionados en la **tabla 1**. El análisis de los brotes atribuye la contaminación a la mala disposición de residuos sólidos, preparación de los alimentos varias horas antes del consumo, fallas en el suministro de agua potable, contaminación cruzada, fallas en el transporte de los alimentos, manipuladores sin capacitación ni elementos adecuados. (Ospina, 2019)

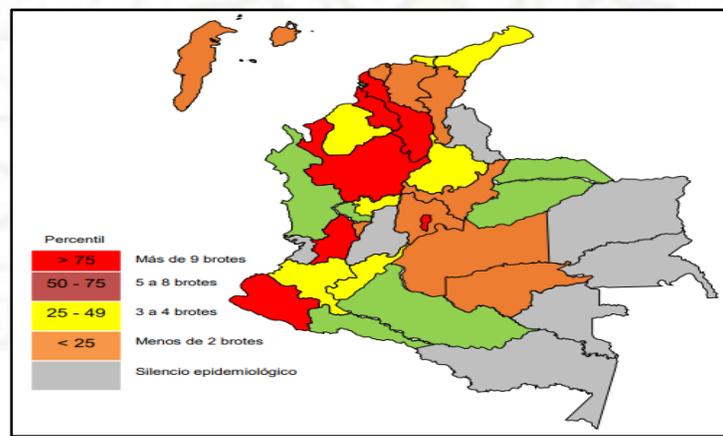
Tabla 1. Proporción de alimentos causantes de brotes en Colombia del año 2000 al 2019.

Grupo de alimento	Proporción
Carnes y productos cármicos	21,4
Queso	16,6
Mezclas de arroz	16,0
Alimentos compuestos	8,0
Alimentos mixtos	7,0
Pescados y productos de la pesca	7,0
Agua y productos a base de agua	4,8
Sal, hierbas aromáticas, especias, condimentos, vinagre, sopas, salsas, ensaladas	3,7
Frutas, verduras y hortalizas	3,2
Comidas rápidas	2,7
Leche y derivados lácteos	2,7
Pan y productos de panadería	2,7
Cereales	1,6
Huevos y productos a base de huevo	1,6
Confitería	1,1

Fuente: Grupo de Gestión del Riesgo, Respuesta Inmediata y Comunicación del Riesgo

El monitoreo de los brotes causados por alimentos en Colombia inició el año 2000 con 2.983 casos aumentando gradualmente cada año hasta 2019; el año con menos reporte de brotes fue el 2020 con un total de 501, 50% menos que el año anterior atribuido al aislamiento preventivo por el SARS-CoV 2. Durante el 2021 se presentaron alrededor de 13 brotes semanales en el 98% de las entidades territoriales con un total de 684 brotes. Los casos fueron reportados en Cali, Cesar, Antioquia, Sucre y Valle del Cauca afectando mayormente a mujeres entre 20 y 49 años. La mayor cantidad de brotes fueron reportados en hogares y restaurantes, pero las personas más afectadas se encontraban en centros carcelarios. (Ospina, 2022).

Imagen 1. Comportamiento brotes de ETA, Periodo epidemiológico III, Colombia 2019.



Fuente: Grupo de Gestión del Riesgo, Respuesta Inmediata y Comunicación del Riesgo

El yogurt es el derivado más conocido a nivel mundial gracias al investigador Yilia Metshnikoff quien ganó el premio Nobel de medicina en 1980 por exponer los beneficios del producto y los microorganismos contenidos en él como *Lactobacillus bulgaricus* para las características organolépticas deseables y su acción de inhibición de otros organismos. Posteriormente se descubrió que las enzimas degradan los azúcares de la leche haciendo más fácil su digestión para personas “intolerantes”. (Díaz, 2013)

4.2 TEÓRICO

4.2.1 Generalidades de la leche

Se le da el nombre de leche a la secreción natural de las glándulas mamarias de mamíferos; en el caso de los bovinos es el alimento básico de sustento para terneros recién nacidos ya que contiene todas las características nutricionales e inmunológicas necesarias para su desarrollo. Al inicio del periodo de lactancia antes del parto, su consistencia es espesa, color amarillento y muy aromatizada recibiendo el nombre de “calostro”; las 72 horas siguientes

al parto sus características cambian dentro de la ubre de la vaca y regresa a su composición conocida para ser usada como suplemento alimentario. (Troncoso, 2014)

Los nutrientes y minerales encontrados en la leche proceden del torrente sanguíneo de la vaca que se permean mediante capilares y el vaso-lateral de células epiteliales en las glándulas mamarias (*diagrama 1*); una vez en las glándulas ingresan a la vía sintética en donde se promueven cambios en algunos componentes y otros como minerales, hormonas y ciertas proteínas mantienen su estructura original. Los sustratos principales extraídos de la sangre por las glándulas mamarias son glucosa, aminoácidos, ácidos grasos, β -hidroxibutirato y sales minerales. La lactosa es el carbohidrato de mayor importancia en la leche compuesto por glucosas y galactosa (*diagrama 2*) unidos de manera covalente; su síntesis se da en las células secretoras de las glándulas mamarias gracias al aporte de glucosa que da el flujo sanguíneo. (Troncoso, 2014)

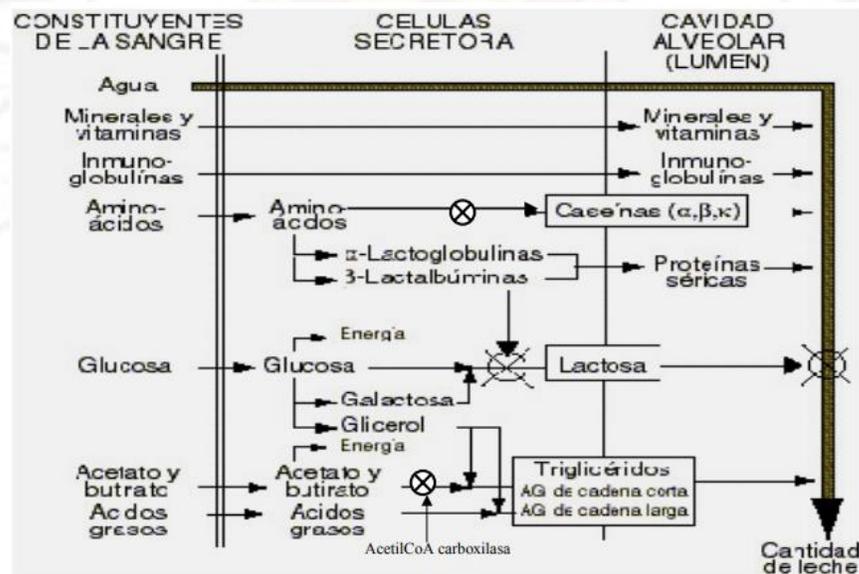


Diagrama 1. Síntesis de los componentes de la leche.

Fuente: Departamento De Producción Animal Y Pasturas Facultad De Agronomía-Udelar

Adicionalmente la leche está formada por grandes cantidades de agua alrededor del 87% que depende de la secreción de lactosa entre el 3,8 y 4,6%, y los iones de potasio, sodio y cloro. Proteínas (3,4 a 3,8%), grasas (3,2 a 4,0%), minerales (0,8 a 1%) y algunas vitaminas (0,1 a 0,2%). Estos valores están sujetos a variaciones por la raza del animal, su alimentación, manejo de animal, periodo de lactancia, época del año, entre otras. (Troncoso, 2014)

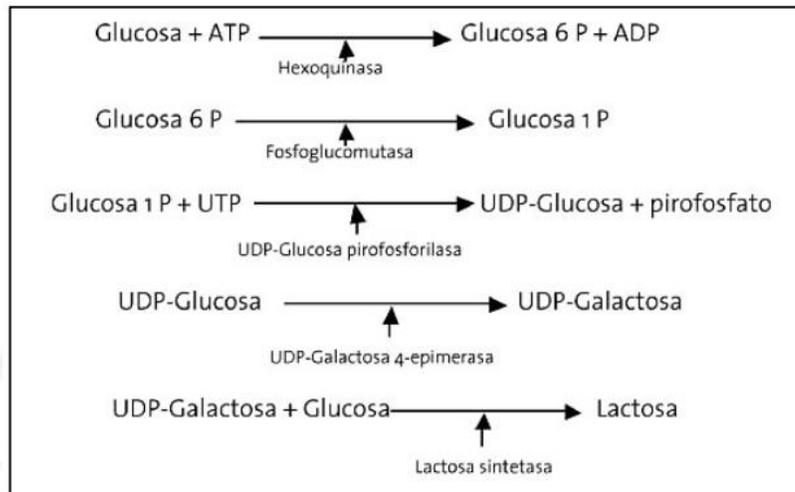


Diagrama 2. Síntesis de la lactosa

Fuente. (Humberto Troncoso A. 2014. *Entorno Ganadero N° 44*. BM Editores. Depto. de Nutrición Animal y Bioquímica, FMVZ, UNAM.)

4.2.2 Definiciones relacionadas.

El **decreto 616 del 2006** define detalladamente leche cruda como leche que no ha sido sometida a ningún tipo de terminación ni higienización.

La **leche** es definida por la normativa Colombiana como el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños completos, sin ningún tipo de adición, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración posterior (Decreto 616, 2006); de ella existen variedades modificadas por la industria para cubrir las necesidades del cliente. encontramos la **leche deslactosada** en donde la lactosa ha sido desdoblada por un proceso tecnológico en glucosa y galactosa, como mínimo , en un 85%, **leche termizada** que se logra al someter la leche cruda a un tratamiento térmico con el objetivo de reducir el número de microorganismos presentes y permitir su almacenamiento de manera prolongada, **leche ultrapasteurizada** que se da mediante un proceso térmico en flujo continuo, en una combinación de temperatura entre 135°C a 150°C durante un tiempo de 2 a 4 segundos, seguido inmediatamente de enfriamiento hasta la temperatura de refrigeración y envasado en condiciones de alta higiene, en recipientes previamente higienizados y cerrados herméticamente, de tal manera que se asegure la inocuidad microbiológica del producto sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas y organolépticas, la cual deberá ser comercializada bajo condiciones de refrigeración y finalmente, **leche ultra-alta-temperatura UAT (UHT)** que es el producto obtenido mediante proceso térmico en flujo

continuo, aplicado a la leche cruda o termizada a una temperatura entre 135°C a 150°C y tiempos entre 2 y 4 segundos, de tal forma que se compruebe la destrucción eficaz de las esporas bacterianas resistentes al calor, seguido inmediatamente de enfriamiento a temperatura ambiente y envasado aséptico en recipientes estériles con barreras a la luz y al oxígeno, cerrados herméticamente para su posterior almacenamiento, con el fin de que se asegure la esterilidad comercial sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas y organolépticas, la cual puede ser comercializada a temperatura ambiente (Decreto 616, 2006).

En la planta se han modificado características comunes de la leche para ofrecer bienestar a todo tipo de consumidor con ofertas bajas en grasa, semidescremadas, totalmente descremadas, entera, balance (con menos grasa y más vitaminas); en envases cómodos y prácticos para todas las familias. La familia de productos se caracteriza por ser amplia y variada conteniendo en ella alimentos como crema, avena, arequipe, yogurt, gelatina, refrescos, chocaleche, maquila de Milo, suero, quesos y el foco de atención de este trabajo, leche UAT/UHT en todas sus variedades.

La **crema de leche** es definida por la NTC 930 de 2008 como un producto lácteo obtenido por reposo, centrifugación de la leche u otro proceso tecnológico adecuado (NTC 930, 2008); las variedades ofrecidas por la empresa son semidescremada, light, finas hierbas, cebolla y libre con adiccionados que las hacen una experiencia única.

Se establece como **Yogurt** al producto obtenido a partir de la leche higienizada, coagulada por la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus termóphilus*. los cuales deben ser abundantes y viables en el producto final. (MPS 02310, 1986)

El **arequipe** es el producto higienizado obtenido por la concentración térmica de una mezcla de leche y azúcares (MPS 02310, 1986). Es ofrecido al mercado en distintas presentaciones y tamaños como también apetecido por diversas empresas.

La **chocaleche** y **milo** se considera una bebida láctea saborizada que es descrita por la normativa, como el producto higienizado, obtenido a partir de una mezcla de leche o leche recombinada y otros ingredientes permitidos (MPS 02310, 1986).

El **suero** también es descrito como el residual obtenido a partir de la leche en la elaboración del queso o la mantquilla que cuenta con características mucho más ácidas en comparación con los demás derivados (MPS 02310, 1986).

El producto que se obtiene por coagulación de leche, de la crema de leche, de la crema de suero, del suero de la mantequilla o de la mezcla de algunos o todos estos productos, por la acción del cuajo u otros coagulantes es considerado **queso** (MPS 02310, 1986). La planta recientemente ha adquirido proyectos y retos representativos en la industria quesera que prometen expandir el mercado.

4.2.3 Microorganismos asociados

La leche por su alto contenido de nutrientes, agua, proteínas y pH cercano a la neutralidad ofrece un medio de crecimiento adecuado para microorganismos de gran variedad; es producida de manera estéril en la ubre de la vaca, pero al ser extraída es expuesta a altas cargas microbianas que llevan a su deterioro y alteración. Como ventaja contiene distintos factores antimicrobianos. La lactoferrina que contiene propiedades quelantes de hierro, lisozimas, inmunoglobulinas, lactoperoxidasa cataliza la síntesis de compuestos bacterianos, ácido fólico y proteínas unidas a la vitamina B12. (Carrillo y colaboradores, 2007).

Existen microorganismos necesarios para la generación de derivados lácteos ya que aportan aroma y características deseables en la leche; entre ellos encontramos las bacterias lácticas como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, entre otros. También presentes en el microbiota común de la leche son *Pseudomonas spp*, *Micrococcus*, *Staphylococcus spp*, levaduras y microorganismos causantes de enfermedad como *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria* y *Serratia*. Las bacterias lácticas tienen la característica de aportar beneficios al producto y al consumidor, su actividad en la leche genera una mayor disponibilidad de nutrientes como ácidos grasos, vitamina B1, P, Mn, Zn Fe con fácil digestión; también actúan disminuyendo los niveles de colesterol en sangre, regulando la producción de enzimas dañinas, hidrólisis de la β -galactosidasa que no es digerida por todos los organismos humanos e inhibición de células tumorales. Se les atribuyen las llamadas propiedades probióticas gracias a su capacidad de sobrevivir en un 51,2 % dentro del fleo del colon por la ingestión de productos fermentados. (Carrillo y colaboradores, 2007).

Dentro del microbiota de la leche encontramos también microorganismos que alteran y deterioran los componentes principalmente de origen proteico; los de mayor frecuencia son *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. fragi* y *Burkholderia cepacia* que contaminan la leche a través del suelo, agua, utensilios de ordeño, tanques y transporte. Aun la leche pasteurizada puede adquirir contaminación desde 1 UFC/mL con estos agentes por exposición a ambientes o equipos contaminados y perder todas sus propiedades a los 5 días. La viscosidad no deseada de la leche se puede deber a microorganismos de las especies *Enterobacter spp*, *Streptococcus spp* y *Alcaligenes spp*, muestras que *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* producen cambios de color azul o rojo. (Carrillo, 2007).

Microorganismos esporulados como *Bacillus spp* y *Clostridium spp*, llegan a contaminar la leche por deficiencia en las prácticas de desinfección a la hora del ordeño y en la ultra pasteurización la leche se puede contaminar por las resistencias de sus esporas especialmente los microorganismos de origen aeróbico ya que en los anaeróbicos tiene un potencial de reducción relativamente alto. debe proporcionar condiciones adecuadas para evitar su proliferación por lo que no suponen un problema. (Rosenberg, 2022).

Los alterantes de derivados lácteos llegan a ellos por contaminación de superficies o utensilios que son usados en la línea de producción, cepas de *Lactobacillus plantarum* forman depósitos cristalinos en la superficie de los quesos por gran cantidad de D-lactato durante el curado. Los mohos y levaduras como *Candida Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Yarrowia* y *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Fusarium* producen ranciamiento y pigmentación desagradable en queso y yogurt. (Carrillo, 2007).

Los microorganismos patógenos para el ser humano contaminan la leche por condiciones anormales en la ubre de la vaca al momento del ordeño. Las infecciones, enfermedades o prácticas lecheras inadecuadas permiten esparcir gran cantidad de células mastitis, *Staphylococcus aureus*, *estreptococos S. agalactiae*, *S. uberis* y *E. coli* dentro de la leche y en casos más severos *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa* y *Corynebacterium bovis*. Diversos estudios han logrado aislar organismos patógenos como *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *M. paratuberculosis*, *Salmonella spp*, *Campylobacter* y *Yersinia enterocolitica*. (Carrillo, 2007).

4.2.4 Pasteurización y esterilidad comercial de la leche UHT

La leche cruda o que no ha pasado por un tratamiento térmico tiene una vida útil muy corta debido a la presencia de microorganismos y enzimas proteasas y lipasas que degradan sus componentes (Simpson, 2000); es por esto que para alargar la vida útil conservando la mayor cantidad de propiedades nutricionales del producto se estableció el protocolo para el proceso de Ultra Alta Temperatura (UHT).

El tratamiento térmico UHT consiste en tratar la leche en un proceso de flujo continuo que inicia con un precalentamiento, esterilización a 138°C a 145°C durante 2 a 10 segundos y finalmente un enfriamiento en un corto tiempo. Es un proceso mucho más rápido que la pasteurización tradicional y tiene como ventaja la reducción en la pérdida de sabor y nutrientes de la leche; permite lograr la esterilidad con bajo impacto en las cualidades del producto. (Rosenberg, 2022) Cuando la leche cruda pasa por un proceso de terminación se reduce significativamente el microbiota presente y pasa a considerarse leche estéril.

La **leche esterilizada** es definida por el Decreto 616 del 2006 como el producto obtenido al someter la leche cruda o termizada, envasada herméticamente a una adecuada relación de temperatura y tiempo 115°C a 125°C por 20 a 30 minutos, enfriada inmediatamente a temperatura ambiente. El envase debe ser un recipiente con barreras a la luz, al oxígeno y la humedad, de tal forma que garantice la esterilidad comercial sin alterar de ninguna manera ni su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas y organolépticas. Se puede comercializar a temperatura ambiente. (Decreto 616, 2006) La calidad en la esterilidad del producto UHT debe garantizarse hasta por un periodo de 90 días calendario en envase flexible y por 180 días para rígidos; cuando estas condiciones no se cumplen se considera un problema de esterilidad comercial.

La **esterilidad comercial** de un alimento tratado térmicamente según la NTC-4433 de 2006 es el estado que se consigue aplicando calor suficiente, sólo o en combinación con otros tratamientos apropiados, con el objeto de liberar a ese alimento de microorganismos patógenos y de otros microorganismos capaces de reproducirse en él en unas condiciones normales no refrigeradas en las que se mantendrá probablemente el alimento durante su distribución y almacenamiento. (NTC-4433, 2006)

Las industrias que ofrecen productos UHT bajo reglamento normativo colombiano están obligadas a garantizar la calidad del sistema de inocuidad aplicado. La pérdida de esterilidad en UHT es comúnmente relacionada con fallas en la temperatura de pasteurización, cortes en los ciclos, inadecuado manejo de protocolos de limpieza y desinfección, falencias de desinfectantes, contaminación cruzada y bioterrorismo. Los principales objetivos de los procesos de tratamiento UHT son microorganismos formadores de esporas como *B. cereus* y *Clostridium* quienes reportan mayor resistencia en los procesos. (Hilton, 2022). Un producto UHT contaminado con un agente como *B. cereus* por pérdida de esterilidad y que no fue detectado antes de su liberación al mercado supone un riesgo inherente para la salud y seguridad pública, ya que como en el caso mencionado el microorganismo es generador no solo de esporas sino de una enterotoxina potencial y otra llamada cereulide de alta resistencia, que fácilmente pueden desencadenar una toxiinfección alimentaria en los consumidores.

4.2.5 Identificación y caracterización de contaminantes microbiológicos

La detección de microorganismos que supongan riesgo a la calidad e inocuidad del producto es el foco de análisis microbiológico en toda la industria láctea. Los métodos de microbiología tradicional como la siembra en placa, tinción gram, recuentos, análisis de características físico químicas básicas y la observación del microorganismo a través del

tiempo en medios selectivos y diferenciales, brindan resultados eficientes en la determinación de contaminación microbiana; sin embargo, su montaje y lectura conlleva largos periodos de tiempo aún bajo técnicas de rápido análisis con medios especializados como PETRIFILM de la compañía 3M. La caracterización de cepas microbiológicas después de su identificación se realiza de manera cotidiana con técnicas moleculares especializadas como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y ELISA (Inmunoabsorción Ligada A Enzima).

4.2.5.1 Métodos de detección rápida

Como se mencionó anteriormente los métodos microbiológicos tradicionales, aunque eficientes no generan resultados a corto plazo que permitan la alerta en pérdidas de esterilidad de manera temprana favoreciendo la retención del producto no conforme con presencia de microorganismos. Gracias a los avances biotecnológicos se han desarrollado sistemas rápidos especializados en el análisis de alimentos llamados Métodos Microbiológicos Rápidos (RMM) basados en técnicas probadas, precisas y confiables en menor tiempo y con menos intervenciones del analista; estos métodos permiten abordar de manera rápida las posibles contaminaciones, liberación más rápida de productos, evitar las paradas en la línea de producción y reducir costos en la cuarentena de los productos. Los RMM emplean marcadores celulares de crecimiento, viabilidad o suplementos de un determinado microorganismo, este tipo de sistemas son automatizados, sensibles y ampliamente utilizados en análisis clínicos de muestras de pacientes. Antes de que un RMM sea implementado en la industria alimentaria, el analista debe evaluar su utilidad en comparación a los protocolos rutinarios y tradicionalmente empleados. (Peris-Vicente, 2015)

Algunos años atrás fue lanzado al mercado por la compañía MERCK el sistema **Milliflex® Quantum** que es una tecnología basada en fluorescencia diseñada para la detección cuantitativa rápida de microorganismos. Esta tecnología ofrece un flujo de trabajo más sencillo, rápida validación, sistema económico y robusto, y facilidad de ubicación en espacios pequeños. Cuenta con tecnología de filtración por membrana (*imagen 2*) que permite el análisis de grandes cantidades de muestra; después de un periodo de incubación se aplican reactivos de tinción y fluorescencia a la membrana revelando los microorganismos viables y cultivables presentes en el producto. El fluorocromo de los reactivos es liberado dentro de la membrana de los microorganismos para luego ser revelado bajo la excitación en la longitud de onda respectiva dentro del **Milliflex® Quantum** (*imagen 2*). Esta tecnología fue validada para la industria láctea UHT, pero no logró su implementación total debido al bacilo esporulado resistente a alta temperatura no alterante presente en este tipo de productos ya que su permanencia en la leche no supone un riesgo para la inocuidad y si interfiere con la lectura de éste equipo generando evidentes falsos positivos. (MERCK, 2020).



Imagen 2. Milliflex® Quantum

Fuente: MERK, 2023

4.2.5.1.1 BacT/ALERT 3D de BIOMERIEUX

BacT/ALERT 3D es un sistema cualitativo de alerta temprana de contaminación microbiana creado por la empresa BIOMERIEUX que tiene como base de funcionamiento mediciones de reflectancia leídas por un fotodiodo cada 10 minutos. El equipo cuenta con software integrado con toda la información de funcionamiento que se maneja y monitorea desde el panel del operador (*imagen 3*), dos módulos iniciales de incubación ampliables y con agitación constante, un lector de código de barras, teclado, barras calibradoras de celdas, etiquetas limitantes, termómetro extraíble y sistema de soporte eléctrico. Los módulos de incubación contienen 3 Racks (gradillas horizontales) cada uno con disponibilidad de 20 celdas independientes por rack en donde se ingresarán las botellas para lectura. Cada celda tiene en su interior un diodo (emisor de luz) que se activa con el ingreso de una botella iFA Plus, iluminando el sensor colorimétrico ubicado en la base de esta, y un fotodiodo (receptor de luz) que realiza lecturas de UR (unidades de reflectancia).



Imagen 3. Sistema BacT/ALERT 3D

Fuente: BIOMERIEUX S.A

Las botellas empleadas para el análisis de productos lácteos son de referencia **iFA Plus** (*imagen 4*) y se suministran únicamente por la compañía proveedora del sistema BIOMERIEUX. Son resistentes, esterilizables, transparentes y su sello está recubierto por dos capas de policarbonato que le permiten mantener la atmósfera interna; están debidamente estandarizadas para la detección de diferentes microorganismos aerobios y anaerobios facultativos ya sean bacterias u hongos en lácteos UHT. Contienen un etiquetado en donde se consigna la información de la botella, código de barras de identificación en el sistema, regla medidora de volumen, espacio para identificación manual e información de expiración. Las botellas contienen 30 mL de medio complejo con peptona, extractos biológicos, anticoagulantes, vitaminas y aminoácidos, fuente de carbono, oligoelementos, otros sustratos complejos en agua purificada, perlas de polímeros absorbentes, una atmósfera bajo vacío de N_2 , O_2 y CO_2 ; y como característica principal de detección en la base de cada botella se encuentra fijado un Sensor de Líquido Emulsionante (LES) que permite la permeabilidad del CO_2 en su interior; también contiene un indicador de pH que vira de gris a amarillo conforme disminuye el pH dentro de la botella.

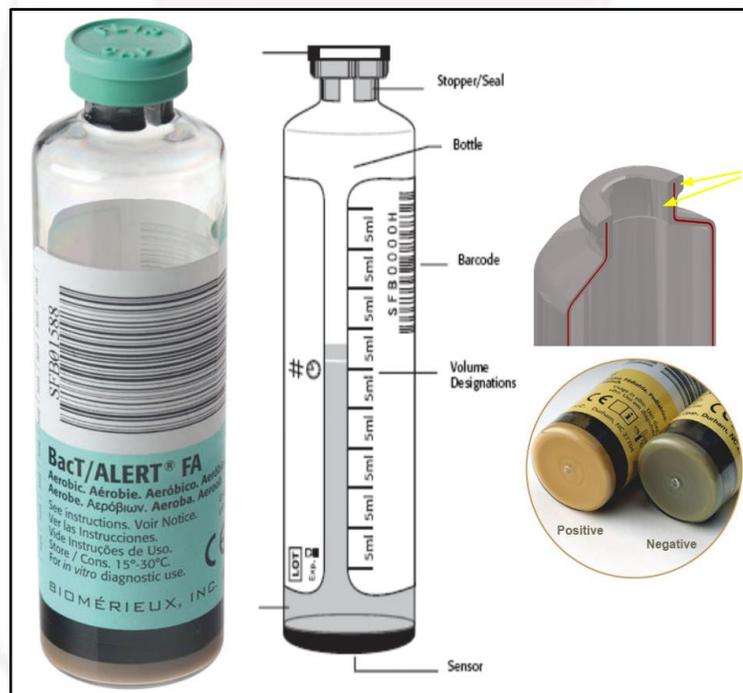


Imagen 4. Botellas iFA Plus, BacT/ALERT 3D

Fuente: BIOMERIEUX S. A

4.2.5.1.2 Principio de funcionamiento BacT/ALERT 3D

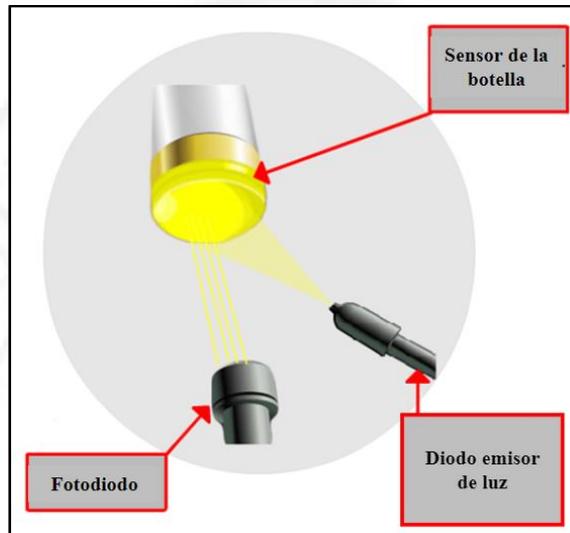


Imagen 5. Principio funcionamiento BacT/ALERT 3D

Fuente: BIOMERIEUX S. A

El principio de funcionamiento del sistema BacT/ALERT 3D se basa como se mencionó anteriormente en la detección de contaminación microbiológica en muestras por aumento de un metabolito fundamental detectable dentro de la atmósfera controlada de la botella iFA PLUS, CO₂.

Al inocular una botella iFA Plus con 10 mL de muestra contaminada los nutrientes del medio en la botella, la temperatura de 37°C y la agitación suave que ofrece el sistema promueven el crecimiento de cualquier microorganismo presente. Al aumentar el metabolismo microbiano se genera de manera natural CO₂ que penetra el sensor colorimétrico permeable a este gas ubicado en la base de la botella provocando la caída del pH. Con la disminución del pH en el sensor, se produce un cambio de color en este de gris a amarillo por acción de un indicador cuyas especificaciones fueron restringidas por el proveedor; el diodo emisor que se encuentra al interior de cada celda del sistema ilumina constantemente el sensor colorimétrico de la botella generando unidades de reflectancia (UR) que son captadas cada 10 minutos por un fotodiodo junto a él. Con el descenso del pH por el aumento del CO₂ el indicador del sensor cambia de gris (menor reflectancia) a amarillo (mayor reflectancia) emitiendo así mayor cantidad de UR que serán leídas por el fotodiodo emitiendo una ALERTA TEMPRANA DE CONTAMINACION MICROBIANA en la muestra analizada. La botella tiene una cantidad de CO₂ inicial que es reconocida por el equipo y de la cual parten las lecturas, las UR son graficadas respecto al tiempo por el sistema (imagen 5).

4.3 LEGAL

La normativa Colombiana vigente para la industria láctea que es aplicada en la empresa en donde se realizó la validación comprende resoluciones y decretos con parámetros y lineamientos para la recolección, transporte, procesamiento, , etiquetado, distribución y comercialización de lácteos y sus derivados garantizando la calidad e inocuidad en toda la cadena de abastecimiento y comercialización.

4.3.1 DECRETO 616 DEL 2006

Ministerio de protección social por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercialice, expendia, importe o exporte en el país.

En el mencionado decreto se plantea como objetivo principal establecer el reglamento técnico por el cual se señalan los requisitos que debe cumplir la leche de animales bovinos, bufalinos y caprinos destinada al consumo humano, con el fin de proteger la vida, salud e integridad humana y prevenir las prácticas que puedan inducir errores, confusiones o engaños al consumidor. En el decreto también se establecen parámetros aplicables en la producción primaria, procedencia, enfriamiento y destino de la leche, prohibiciones, especificaciones de la matriz, reglamento en plantas, proceso de higienización, reconstitución, pulverización, equipos, envasado, rotulado, aseguramiento y control de calidad, transporte, expendio, vigilancia y control junto con las especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas de la leche en sus diferentes variedades de acuerdo a su composición; esto entre otras disposiciones del decreto.

4.3.2 RESOLUCIÓN 2115 DEL 2007

Ministerio de Protección Social por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano.

Se establecen y señalan las características de agua apta para consumo humano, tratamiento y empleabilidad dentro y fuera de las plantas industriales, disposición de aguas residuales, calidad fisicoquímica y microbiológica.

4.3.3 RESOLUCIÓN 2674 DE 2013

Ministerio de Protección Social por el cual se reglamenta el artículo 126 del Decreto ley 019 de 2012 y se dictan otras disposiciones. Proveniente del Decreto 3075 de 1997 por el cual

se reglamenta parcialmente la Ley 09 de 1979 y se dictan otras disposiciones. Regula las actividades de fabricación, procesamiento, preparación, envase, almacenamiento, transporte, distribución y comercialización de alimentos en el territorio nacional. Proveniente de la Ley 9 de 1979 del Ministerio de Salud:

Por la cual se dictan medidas sanitarias para el sector alimentario. Código Sanitario Nacional por cuanto dicta medidas sobre las condiciones sanitarias básicas para la protección en el medio ambiente, suministro de agua, saneamiento de edificaciones, alimentos, droga, medicamentos, cosméticos, vigilancia y control epidemiológico, prevención y control de desastres, derechos de los habitantes respecto a la salud y todo lo relacionado con **Buenas Prácticas de Manufactura**.

4.3.4 RESOLUCIÓN 2310 DE 1986

Ministerio de Salud Por la cual se reglamenta parcialmente el Título V de la Ley 09 de 1979, en lo referente a procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de los **Derivados Lácteos**.

Se dispone y define de manera general las actividades y productos que derivan de lácteos como leche fermentada, leche saborizada, crema de leche, mantequilla, aceite o grasa de mantequilla, suero, arequipe, manjar blanco, leche condensada, leche en polvo, postre de leche, helado, la producción en plantas, envasado y almacenamiento, control, rotulado y disposiciones diarias.

4.3.5 NORMA TÉCNICA COLOMBIANA-ISO 22000 DEL 2005

Por la cuál se dicta el sistema de gestión de la **inocuidad** de los alimentos como requisitos para cualquier organización de la cadena alimentaria.

El control de peligro en los alimentos está directamente relacionado con la inocuidad. Los peligros pueden estar presentes o incluirse en cualquier punto de la cadena alimentaria es necesario realizar un control riguroso a lo largo de esta; para lograr la inocuidad se hace un esfuerzo combinado de todas las partes involucradas en la cadena alimentaria. Esta norma brinda los parámetros y lineamientos necesarios para garantizar la calidad e inocuidad de los alimentos.

4.3.6 RESOLUCIÓN 1407 DE 2022

Ministerio de Salud y Protección Social, por la cual se establecen los criterios microbiológicos que deben cumplir los **alimentos y bebidas destinados para consumo humano**.

Se dictan los criterios microbiológicos de alimentos y bebidas para el consumo humanos incluidos, derivados lácteos, productos grasos, bebidas excluidas de lácteos, frutas, bulbos, hortalizas, algas marinas, nueces, semillas, confitería, cereales, pan y pastelería, productos de la pesca, huevos, azúcar, jarabe y miel, especias, aderezos, condimentos, caldos, platos preparados, alimentos infantiles, entre otros.

4.3.7 RESOLUCIÓN 2195 DE 2010

Ministerio de Protección Social por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos que se deben cumplir durante el **proceso térmico** de alimentos envasados herméticamente de baja acidez y acidificados, que se fabriquen, transporten, expendan, distribuyan, importen, exporten y comercialicen para el consumo humano.

Se resaltan los requisitos que se deben cumplir durante el proceso térmico de alimentos envasados herméticamente de baja acidez y acidificados destinados para consumo humano; las condiciones básicas de higiene en la fábrica de alimentos, sistemas de tratamiento térmico para alimentos de baja acidez, control de componente de envases, producción y control en el proceso, aseguramiento y control de calidad.

4.3.8 NORMA TÉCNICA ANDINA PNA 16 007:2007

Por la cual se establecen los requisitos que deben cumplir las **leches fermentadas**, destinadas al consumo humano directo.

Se mencionan los requisitos de los productos lácteos fermentados, etiquetado, inspección, contaminantes, requisitos microbiológicos, especificaciones y calidad de uso de microorganismos beneficios. Esta norma se aplica a las leches fermentadas: yogur, kefir, kumis, leche cultivada o acidificada, bebida láctea a base de leche fermentada.

4.3.9 NORMA TÉCNICA ANDINA PNA 16 006:2007

Establece los requisitos que debe cumplir la **leche fluida** con ingredientes destinados al consumo humano.

Lineamientos establecidos en la región andina para los productos lácteos, etiquetado, calidad microbiológica y fisicoquímica con bases de estudio ICONTEC.

4.3.10 NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 1419 DE 2004

Por la cual se establecen los requisitos y ensayos que debe cumplir la **leche líquida saborizada** obtenida por cualquiera de los medios de higienización que se incluyen en la presente norma.

Se tratan requisitos específicos para leche saborizada ensayos, envases, muestreo, rotulado, caracteres microbiológicos y fisicoquímicos.

4.3.11 NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 4433 DE 2006

Por la cual se establece el procedimiento para determinar si los alimentos envasados en envases o bolsas, herméticamente cerrados, cumplen con los **requisitos de esterilización comercial** a los que se sometieron y se aplica a todos aquellos alimentos catalogados como comercialmente estériles, cuando se desee comprobar esta condición o cuando los datos del proceso no estén disponibles o no sean satisfactorios.

Se consigna la desinfección, medio de cultivo y reactivos usados para la evaluación de la esterilidad comercial, mecanismos de muestreo, limpieza, desinfección, apertura de envases, análisis microbiológicos interpretación y reporte de resultados, diagramas de inspección e informe de resultados.

4.3.12 NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 930 DE 2008

Establece los requisitos que debe cumplir la **crema de leche**, la crema de leche para batir o montar, la crema de leche batida o montada, la crema de leche en polvo, que se destinan para el consumo directo y que han sido sometidas a pasteurización, esterilización o ultra alta temperatura UHT (UAT).

Rige la clasificación y requisitos generales para la producción y comercialización de crema de leche en sus variaciones, requisitos fisicoquímicos y microbiológicos, aceptación, rechazo, ensayos, rotulado, envase y aditivos de las mismas.

5. MÉTODOS

5.1 AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS

Preliminar

Se hizo un análisis de los contaminantes microbianos dentro de la planta y se seleccionaron aquellos con mayor riesgo o incidencia en contaminación para ser enfrentadas al sistema. Se eligieron los microorganismos *Bacillus cereus*, *Staphylococcus spp*, *Enterobacter spp* y *Pseudomonas aeruginosa* como potenciales para aislamiento.

Búsqueda y aislamiento.

Se realizaron muestreos dentro de la planta en puntos de posible contaminación con los microorganismos elegidos.

5.1.1 Pseudomonas spp

Materiales y reactivos

Se usaron tubos de hisopado con caldo BHI (Infusión cerebro Corazón), se empleó el medio CETRIMIDE de casa comercial Merck suplementado con 10 ml/L de glicerol para el aislamiento de *Pseudomonas spp*. cuya composición se observa a continuación:

FÓRMULA	
PEPTONA DE GELATINA	20.0 g
CLORURO DE MAGNESIO	1.4 g
SULFATO DE POTASIO	10.0 g
AGAR	13.6 g
CETRIMIDA	0.3 g
GLICERINA	10 ml
AGUA PURIFICADA	1000 ml
pH FINAL: 7.2 ± 0.2	

Imagen 6. Composición agar Cetrimide

Fuente: Britanialab, 2021.

Incubadoras marca Memmert a 37°C, asas y cajas de Petri estériles, microscopio OLYMPUS CX23.

Aislamiento

Se muestrearon 3 depósitos agrietados de residuos de leche cruda y agua lluvia en agar cetrimide aplicando pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa y tinción gram hasta obtener 3 cepas por confirmar.

Identificación

Para la identificación la cepa fue enviada con menos de 24 horas de crecimiento a un laboratorio de identificación externo llamado CORPOGEN.

5.1.2 Enterobacteria

Materiales y reactivos

Se usaron cajas de Petri estériles con agar Violeta Rojo Bilis Agar (composición descrita en tabla 7), tubos de 10 mL con caldo BHI, incubadoras e hisopos, micropipeta P1000, microscopio OLYMPUS CX23.

FÓRMULA (en gramos por litro)	
EXTRACTO DE LEVADURA.....	3.0
PEPTONA.....	7.0
SALES BILIARES.....	1.5
LACTOSA.....	10.0
CLORURO DE SODIO.....	5.0
ROJO NEUTRO.....	0.03
CRISTAL VIOLETA.....	0.002
AGAR.....	15.0
pH FINAL: 7.4 ± 0.2	

Imagen 7. Composición medio VRB.

Fuente: Britanialab, 2021.

Aislamiento

Se muestrearon con hisopados tubos de descarte de leche principales incubando por 24 horas a 37° C en caldo BHI; se inoculó 0,1 mL de cada tubo en cajas de Petri con agar VRB y se aplicó tinción gram.

Identificación

Para la identificación la cepa fue enviada con menos de 24 horas de crecimiento un laboratorio de identificación externo llamado CORPOGEN.

5.1.3 *Staphylococcus spp.*

Materiales y reactivos

Petrifilm Staph Express para *Staphylococcus aureus* de la marca 3M, micropipeta P1000, incubadora, hisopos y caldo BHI. microscopio OLYMPUS CX23.

Aislamiento

Se realizó hisopado directo de las manos de operarios fuera de planta en caldo BHI y se sembró 1 mL en Petrifilm Staph Express para *S. aureus*.

5.1.4 *Bacillus spp*

Materiales y reactivos

Se usaron cajas de Petri estériles con agar Selectivo para *Bacillus cereus* y medio Plate count de la marca Sharlau, tubos de 10 mL con caldo BHI, incubadoras e hisopos, micropipeta P1000, microscopio OLYMPUS CX23

Fórmula * en g/L	
Manitol.....	10,00
Piruvato sódico.....	10,00
Fosfato disódico.....	2,50
Cloruro sódico.....	2,00
Peptona.....	1,00
Fosfato potásico.....	0,25
Sulfato magnésico.....	0,20
Azul de bromotimol.....	0,12
Agar.....	14,00

Imagen 8. Composición medio selectivo para *B. cereus*.

Fuente: Sharlau, 2021

Composición	
Composición (g/l):	
Peptona de caseína.....	5,00
Extracto de levadura.....	2,50
D(+) Glucosa.....	1,00
Agar.....	15,0

Imagen 9. Composición medio PC.

Fuente: Sharlau, 2021

Aislamiento

Durante el periodo de prácticas en la planta de estudio se presentó una pérdida de esterilidad. Se tomaron muestras de producto terminado contaminado y aislaron colonias representativas en agar Plate Count.

Identificación

Una vez aislada, se sembró en superficie de agar PC y con menos de 24 horas de crecimiento se envió a CORPOGEN para su identificación molecular.

5.2 VISTA GENERAL DEL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA

El equipo es un sistema de incubación controlada y agitación constante que analiza las muestras inoculadas en botellas iFA Plus (*ver marco teórico*), que contienen medio de cultivo especializado y un indicador colorimétrico que permite la permeabilidad del metabolito detectable, CO₂. La presencia de microorganismos contaminantes se refleja en el cambio de color del indicador en el sensor de la botella por la caída del pH pasando de gris-verdoso a amarillo; el cambio de color es medido por niveles de reflectancia captadas cada 10 minutos por un fotodiodo dispuesto al interior de cada celda (Biomérieux, 2022).

5.2.1 Inoculación de las botellas

Materiales

En la inoculación de las botellas se hizo uso de materiales y reactivos como jeringas estériles de 10 mL, alcohol al 70%, botellas iFA Plus, potenciómetro S400 SevenExcellence de la marca Mettler Toledo y depósitos de descarte como frasco guardián y caneca verde.

Registro en la trazabilidad empresarial

Se realizó un registro manual de cada una de las muestras a inocular en la respectiva botella teniendo en cuenta información específica de la muestra, fecha de análisis, fecha de vencimiento del producto, código de identificación de cada botella y un desprendible del código de barras de la botella; también contenía información de los resultados arrojados por el sistema para cada muestra y datos de los análisis requeridos posteriormente junto con el analista encargado (Biomérieux, 2022).

Inoculación de botellas

La inoculación de las botellas iFA PLUS con la muestra (*diagrama 3*) inició con la aspersion de alcohol al 70% en la superficie de la bolsa de la muestra y en la boquilla de la botella Ifa Plus a inocular (una vez se retiró el sello protector), se dejó en reposo por un minuto para la evaporación del alcohol y se retiró la jeringa del empaque estéril; se punzó de manera vertical

la bolsa y se extrajeron 10 mL de muestra a analizar de manera cuidadosa evitando la formación de burbujas, se transfirió el contenido de la jeringa a la botella perforando la tapa de policarbonato haciendo la distensión sobre la pared interna de la botella. Se tuvo en cuenta al momento de la eyección de la muestra evitar la entrada de aire a la atmósfera controlada de la botella evitando interferencias con los resultados. Se extrajo la jeringa de manera rápida y la aguja de la jeringa se descartó en un frasco guardián; los demás residuos se desecharon en bolsas verdes. Finalmente, se abrió la superficie de la muestra para la lectura de su pH y temperatura inicial empleando un potenciómetro S400 SevenExcellence de la marca Mettler Toledo. Los residuos de muestras se descartaron según las líneas establecidas. (BIOMERIEUX sistema interno con modificaciones en conjunto con la atora, 2022)

Las muestras inoculadas y llevadas al equipo no tuvieron incubación previa ya que esto interferiría con los resultados. Durante el montaje del análisis se usaron elementos de protección higiénico sanitarios y se cumplieron todos los parámetros de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) pertinentes para evitar contaminación cruzada.

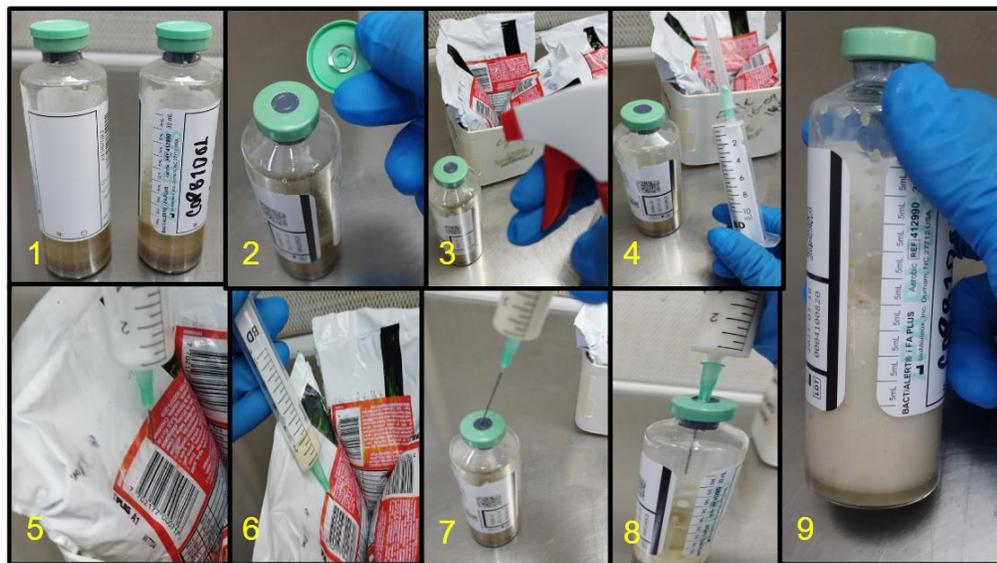


Diagrama 3. Inoculación de botellas iFA PLUS

Fuente: Autora

5.2.3 Ingreso de las botellas inoculadas al equipo

Material

Para el ingreso de botellas en el sistema se hará uso de todos los componentes del mismo como como lector de código de barras, teclado, panel del operador, módulos y las botellas ya inoculadas.

Trazabilidad de la muestra en el sistema

Antes de cumplir 10 minutos de haber inoculado la botella con la muestra se ingresaron al sistema (**Diagrama 4, A**). Se realizó la lectura del código de la botella con ayuda del lector del equipo y con el teclado digitamos el consecutivo de la muestra a analizar que ya asignado en la trazabilidad manual (**B, C, D, E y F**). Se verificó que la información digitada fuera correcta y se abrió módulo de incubación (**G**). (BIOMERIEUX, 2022)

Verificación del módulo e Ingreso de muestras al equipo

Antes de ingresar la botella al equipo se verificó la temperatura del módulo, el periodo de incubación, la calibración de las celdas y que no se manifestaran errores en el funcionamiento. En el módulo se eligió al azar una celda disponible señalada por el equipo con iluminación verde (**H**) y se ingresó la botella hasta que el indicador de la celda se apagó (**I**); finalmente se cerró el módulo de incubación para iniciar el análisis de la muestra (**J**) (Biomerieux, 2022).



Diagrama 4. Ingreso de botellas al sistema

Fuente: Autora

5.2.4 Extracción de muestra de botellas inoculadas para confirmación

Después de cumplido el periodo de incubación o dada la generación de una alerta por contaminación de una muestra fue necesaria la extracción de la botella para su confirmación mediante técnicas de microbiología tradicional como siembra en superficie de placa, tinciones de gran y algunas pruebas bioquímicas. (BIOMERIEUX, 2022)

Materiales

Fueron necesarias las botellas que requieran confirmación, agujas estériles para vía aérea especializadas doble punta suministradas por la entidad proveedora BIOMERIEUX, cajas de Petri estériles con agar Plate Count, incubadoras, asas plásticas estériles y marcador permanente Sharpie.

Extracción de la botella del equipo

Se extrajeron las botellas del equipo abriendo directamente los módulos en donde se encontraban y retirándolas de las celdas (Biomerieux, 2022).

Extracción muestra

Se rompió el sello protector de la aguja estéril doble canal y con el extremo encapotado blanco se pinchó el sello de la botella extrayendo la capota contraria de color transparente exponiendo así la aguja conductora. Con la aguja puesta de manera correcta se vertieron de 5 a 7 gotas (0,1 mL) del contenido de la botella sobre la placa del agar de siembra, terminada la inoculación se extrajo la aguja y se descartó en el frasco guardián. Se extendieron las gotas inoculadas en la superficie del agar con ayuda de un asa estéril y se incubaron a 37°C por 48 horas (Biomerieux, 2022).

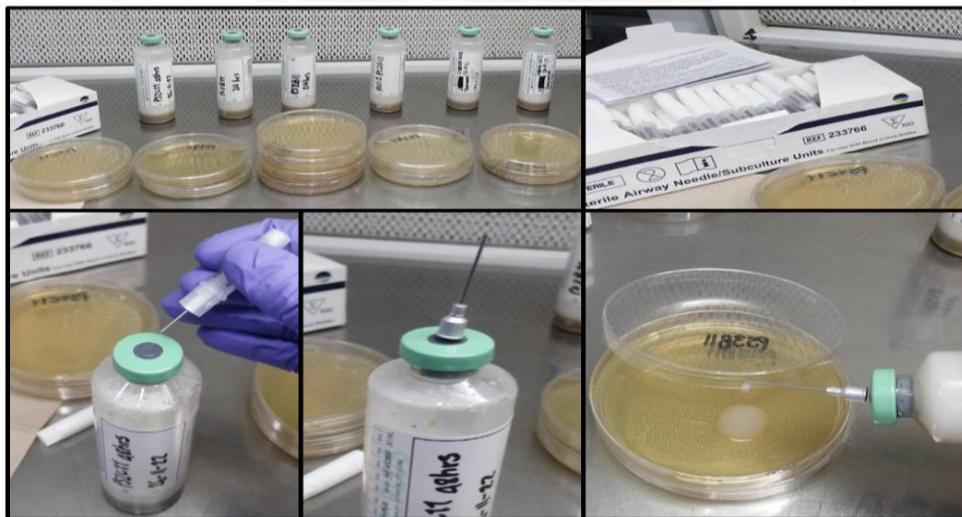


Diagrama 5. Extracción de muestra de botellas inoculadas para confirmación.

Fuente: Autora

5.3 PRUEBA DE PRESENCIA

Materiales y reactivos

En esta prueba se emplearon 3 muestras de la matriz o producto con más incidencia en la presencia de BETNA del mismo lote de producción y sin incubación previa (tomadas directamente de la línea de producción), agujas estériles para la inoculación de las botellas, alcohol al 70%

5.3.1 Primer ciclo de PRUEBA PRESENCIA

Se registraron las muestras para el seguimiento de trazabilidad (las 3 muestras tuvieron características idénticas, ser de la misma referencia y tomadas directamente de la línea de producción), se inocularon en 3 botellas independientes como se muestra en el diagrama 6 sin tomar pH y temperatura evitando contaminación, se selló el orificio de cada bolsa en donde se realizó la punción con una pistola de silicona marca Redline 10w evitando el contacto de la silicona con la muestra. El sellado de la bolsa se verificó bajo presión manual y se llevaron a incubar a 37° C por 24 horas. Las botellas inoculadas se llevaron al equipo para ser analizadas por 4 días a 37° +/-1° C. (BIOMERIEUX sistema interno con modificaciones en conjunto con la atora, 2022)

5.3.2 Segundo ciclo de PRUEBA PRESENCIA

Después de que las muestras estuvieron 24 horas en incubación (*diagrama 6*) se abrieron nuevamente y se inocularon 3 botellas más de manera independiente como en el primer ciclo. Las bolsas se sellaron por segunda vez con silicona, se verificó el sellado y se dejaron en incubación a 37°C por 24 horas más; las botellas se ingresaron al sistema bajo las mismas condiciones (4 días a 37°C +/- 1°C en agitación constante). (BIOMERIEUX sistema interno con modificaciones en conjunto con la atora, 2022)

5.3.3 Tercer ciclo de PRUEBA PRESENCIA

Finalizado el segundo periodo de incubación se realizó un tercer orificio en la muestra con nuevas jeringas, se inocularon 3 nuevas botellas y se llevaron al sistema bajo las mismas condiciones mencionadas en los pasos anteriores. Las muestras que venían analizándose desde el primer fueron debidamente descartadas según las líneas establecidas por la planta. (BIOMERIEUX sistema interno con modificaciones en conjunto con la atora, 2022)

Las botellas se retiraron del sistema cuando se emitió una alerta de detección y las botellas que requirieron confirmación se trataron según lo descrito en el *diagrama 5*.

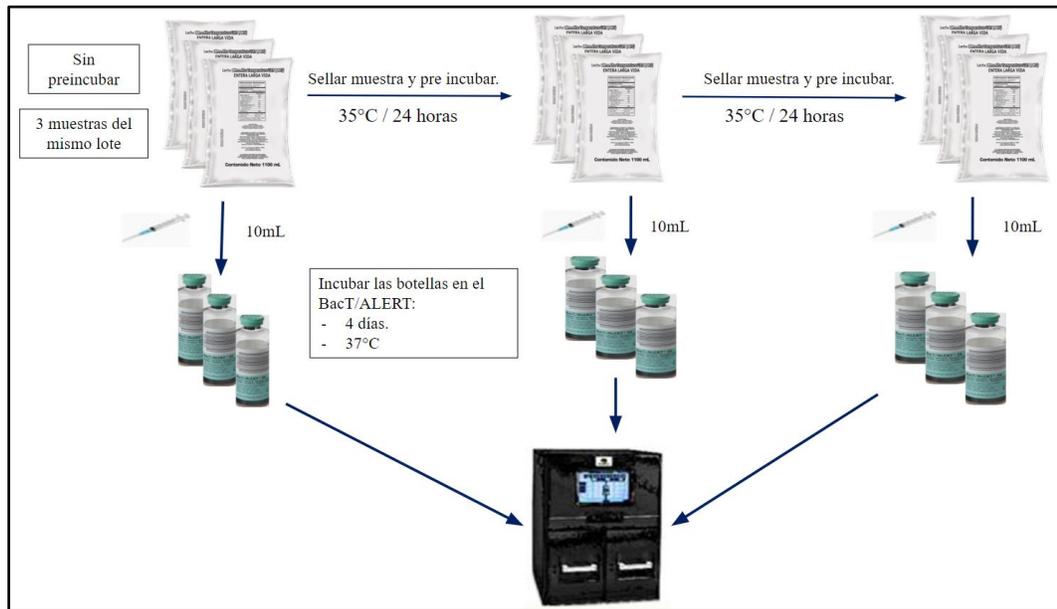


Diagrama 6. Flujo de trabajo prueba de Presencia.

Fuente: Autora.

5.4 PRUEBA DE COMPATIBILIDAD

Materiales y reactivos

Para esta prueba se usaron 90 muestras de seis matrices lácteas distintas (15 de cada una), el sistema BacT/Alert 3D, jeringas estériles de 10 mL agujas doble canal y botellas iFA Plus.

5.4.1 Evaluación para cada lote

Haciendo uso del protocolo de inoculación se analizaron 5 muestras de la misma matriz con igual fecha y hora de producción, pero de diferentes cabezales de una misma envasadora en 3 distintos periodos de producción llamados “lotes” (ejemplo, 5 muestras del 10/09/2022 a las 13:55 de los cabezales A, B, C, D y E; una de cada cabezal por 3 días diferentes de producción). Cada muestra se analizó en una botella independiente y se llevo al sistema en condiciones normales de análisis (4 días a 37°C +/-1°C en agitación) y fueron retiradas del sistema bajo los mismos parámetros de la prueba anterior. Del mismo modo se analizaron todas las matrices que se quisieron evaluar. (BIOMERIEUX sistema interno con modificaciones en conjunto con la autora, 2022)



Diagrama 7. Flujo de trabajo prueba compatibilidad.

Fuente: Autora

5.5 PRUEBA CATASTRÓFICA FASE I

Material

Se emplearon botellas iFA Plus, jeringas de 10 mL y un total de 63 muestras de una misma matriz en 3 diferentes puntos de la línea de producción.

5.5.1 Descripción

Para la prueba catastrófica fase I (**diagrama 8**) se eligió una sola matriz, la de mayor producción y tendencia a pérdidas de esterilidad dentro de la planta. Se programó la toma de muestras durante 3 ciclos de producción completos y se realizaron muestreos cada 3 horas más inicios, paradas, intermedios y finales de producción (Biomerieux, 2022).

5.5.2 Fases 1, 2 y 3

Se toman 3 muestras recurrentes directamente de la línea de producción por un periodo completo de producción que abarco aproximadamente las 24 horas (por cada fase) incluyendo de manera adicional los acontecimientos en la línea como paradas o reinicios; los

muestreos de las horas nocturnas se llevaron a refrigeración hasta su análisis. Las muestras se inocularon en botellas y se ingresaron al equipo según lo descrito en los *diagramas 3 y 4* bajo todas las condiciones de bioseguridad. (ver *diagrama 8*) (BIOMERIEUX sistema interno con modificaciones en conjunto con la atora, 2022)

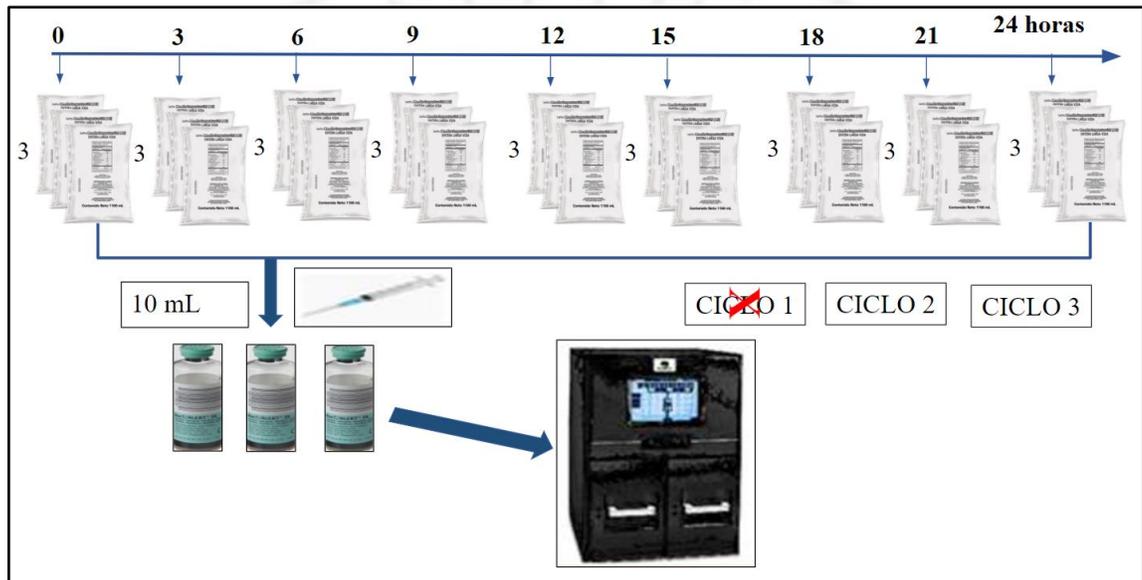


Diagrama 8. Flujo de trabajo prueba catastrófica fase I.

Fuente: Autora

5.6 PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II

5.6.1 Preparación de los inóculos de las cepas aisladas anteriormente

Ya con las cepas identificadas molecularmente por el laboratorio CORPOGEN se realizó un repique en agar BHI. Cuando el cultivo cumplió sus 24 horas de crecimiento se realizó una suspensión de inóculo a un patrón de Mcfarland 2 (6×10^8 ufc/mL) (*diagrama 9*) en agua peptona estéril al 1% (APE). (Samo, 2020)

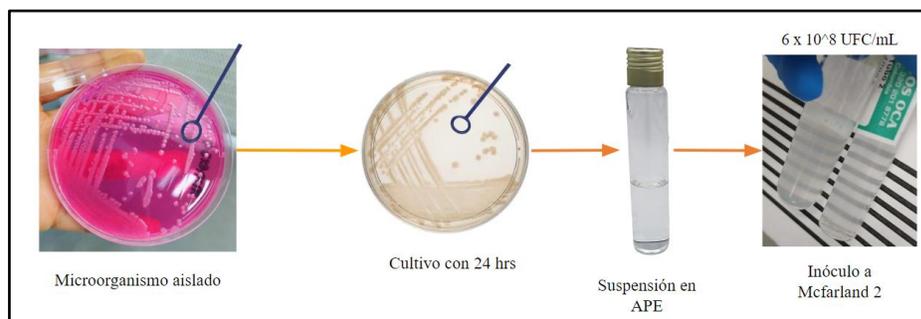


Diagrama 9. Preparación de inóculo.

Fuente: Autora

5.6.2 Diluciones y estandarización de cada microorganismo

Después de tener el inóculo al patrón McFarland deseado (6×10^8) se realizaron diluciones seriadas hasta obtener diluciones de 100 y 10 células por mL adicionando 1 mL del inóculo en 9 mL de APE al 1% (rango de 1 a 10). Se inoculó 1 mL de las 3 y ultimas diluciones por triplicado de cada microorganismo en agar BHI por profundidad se llevó a incubación a 37°C por 24 horas. También se llevaron a incubación controles de esterilidad del medio de cultivo empleado (Samo, 2020). (**Diagrama 10**)

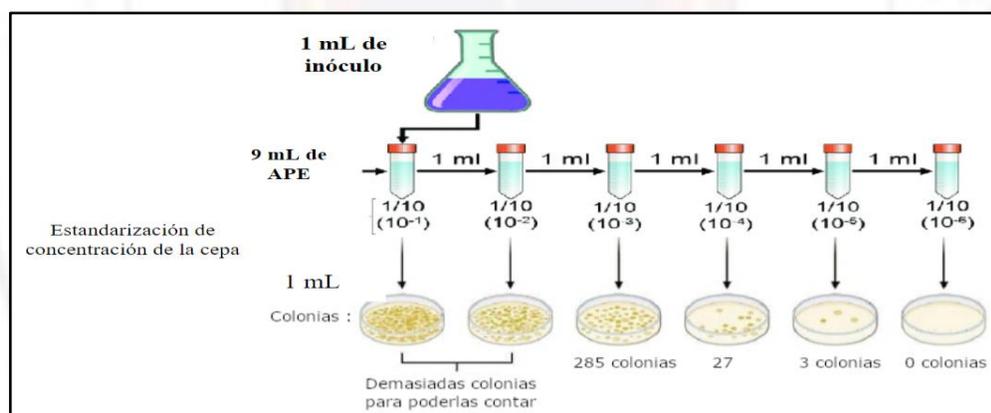


Diagrama 10. Diluciones y estandarización.

Fuente: Autora

Después de transcurrido el periodo de incubación se realizó el recuento e informe microbiológico para una misma dilución por triplicado siguiendo la formula (formula 1) de la ISO 7218 sugerida por el proveedor y aceptada por la planta de la siguiente manera:

$$N = \frac{\sum c}{Vx[N1]xd}$$

Fórmula 1. Informar una sola dilución con 3 placas.

Fuente: ISO 7218

En donde $\sum C$ es la sumatoria de colonias obtenidas en las 3 placas de la dilución, V es el volumen inoculado, N1 es el numero de placas y d es la dilución.

5.6.3 Inoculación de las muestras con los agentes contaminantes

Se inoculó 1 mL de las 3 últimas diluciones seleccionadas para cada microorganismo en muestras independientes de leche entera UHT de 900 mL y se agitó de manera vigorosa (Biomérieux, 2022).

5.6.4 Aplicación de la prueba

El equipo se ajustó a un periodo máximo de incubación de 2 días a 37°C en la aplicación de esta prueba y todas las muestras fueron tomadas directamente de la línea de producción.

Se tomaron 10 mL de cada muestra contaminada con las diferentes concentraciones de los microorganismos y se inocularon en botellas iFA Plus para ser analizadas en el sistema, de igual manera se inocularon 10 mL de una muestra control en otra botella; las muestras se tomaron con las mismas condiciones de fecha, hora, lote e igual envasadora. Las botellas se ingresaron al sistema para su análisis y las bolsas de muestra fueron selladas y dejadas a temperatura ambiente (21°C +/- 1) por 24 horas como lo describe el **diagrama 11** (BIOMERIEUX sistema interno con modificaciones en conjunto con la atora, 2022).

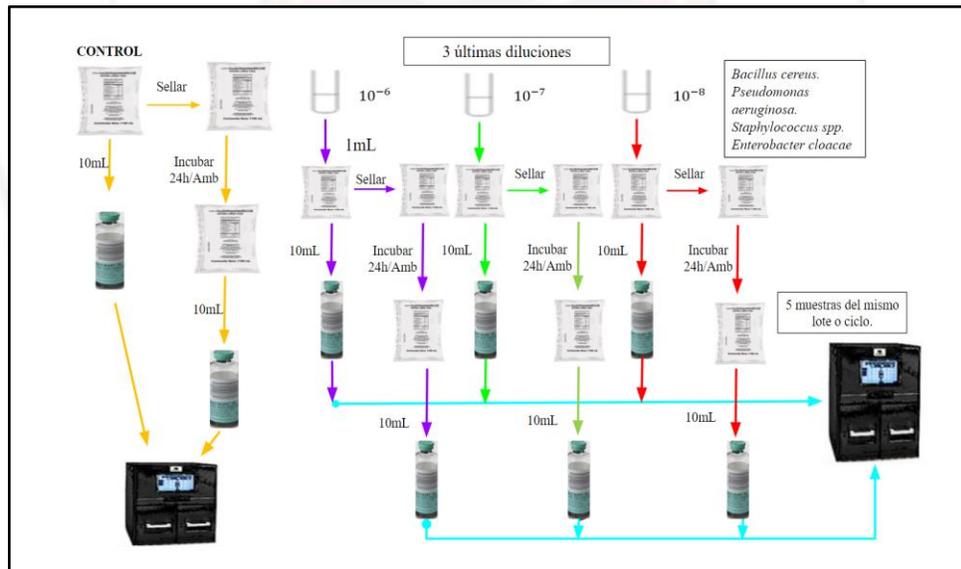


Diagrama 11. Flujo de la prueba catastrófica fase II.

Fuente: Autora

Transcurridas las 24 horas de las bolsas a temperatura ambiente se agitaron manualmente y se inocularon nuevas botellas con 10 mL por cada una de las muestras a analizar, finalmente fueron llevadas al equipo para analizar. Ya con los resultados arrojados por el sistema BacT/ALERT 3D se realizó comparativa de resultados con microbiología tradicional (Biomérieux, 2022).



6. CRONOGRAMA

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES																								
ACTIVIDAD DESARROLLADA DURANTE LA PASANTÍA	FECHA																							
	SEPTIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE				ENERO				FEBRERO			
	SEMANA				SEMANA				SEMANA				SEMANA				SEMANA				SEMANA			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Inicio e inducción																								
Asignación de proyecto																								
Inicio proyecto asignado																								
Recolección de información teórica del sistema																								
Actividades adicionales planta UHT y alterna																								
Aislamiento de cepas enfrentadas al sistema BacT/ALERT 3D																								
Identificación molecular de cepas enfrentadas al sistema BacT/ALERT 3D																								
Llegada del equipo BacT/ALERT 3D																								
Inducción al sistema BacT/ALERT 3D																								
Recolección de muestras para análisis BacT/ALERT 3D																								
Verificación del sistema BacT/ALERT 3D (Compatibilidad y presencia)																								
Verificación del sistema BacT/ALERT 3D (Catastrófica Fase I)																								

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos de resultados de verificación del sistema BacT/ALERT 3D son presentados de manera anónima y con fines netamente informativos debido a las políticas de seguridad de la entidad relacionada.

La eficiencia de la validación depende principalmente de los parámetros y protocolos ofrecidos por la multinacional BIOMERIEUX con modificaciones hechas por la autora en conjunto con líderes de la planta.

7.1 AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS

7.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Se logró aislar e identificar *Pseudomonas aeruginosa* de las grietas y depósitos de agua estancada de la planta; la confirmación de la especie fue dada por el laboratorio externo CORPOGEN.

7.1.2 *Enterobacter cloacae*

Se aisló de las mangueras de descargue de leche cruda la bacteria *Enterobacter cloacae* de la familia de las *Eenterobacteriaceae* cuya especie fue identificada molecularmente por el laboratorio externo ya mencionado.

7.1.3 *Staphylococcus spp*

Se aisló *Staphylococcus spp* partiendo del hisopado de las manos de operadores mediante técnicas de aislamiento e identificación tradicional por lo que no se pudo llevar a una especie.

7.1.4 *Bacillus cereus*

Después de la siembra y el aislamiento de la bacteria contaminante en el producto terminado de la planta se identificó molecularmente por el laboratorio CORPOGEN que el microorganismo implicado fue *Bacillus cereus*

7.2 VISTA GENERAL DEL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA

El sistema emplea para el análisis botellas llamadas iFA Plus que contienen un medio de cultivo complejo con todos los requerimientos nutricionales para el desarrollo microbiano aerobio y anaerobio facultativo, microesferas de polímero absorbente que actúan como neutralizantes de pH y aditivos en la muestra, agua purificada, una atmósfera controlada de N₂, O₂ y CO₂ bajo vacío y en su base un sensor colorimétrico llamado **Sensor Líquido**

Emulsionante (LES) que permite la permeabilidad del CO₂ en él, disminuyendo el pH a medida que el gas aumenta. La caída del pH provoca un cambio en el indicador del sensor que vira de gris-verdoso a amarillo para un resultado positivo. Las especificaciones de los reactivos en la botella como el indicador de pH son exclusivas del proveedor. (BIOMERIEUX, 2021)

BacT/ALERT 3D es un sistema sensible a la producción de CO₂ como resultado del metabolismo microbiano que detecta la liberación de este gas en muy bajas concentraciones. El equipo usa el sensor colorimétrico que está en el extremo de la botella iFA **Plus** junto a un diodo (emisor de luz) y fotodiodo (receptor de luz) ubicados en cada celda de incubación del equipo (una celda por botella) para hacer lectura de las unidades de reflectancia emitidas por el sensor colorimétrico; adicionalmente el equipo cuenta con un sistema de incubación modificable y agitación constante (Konrad, 2013). Una vez se inocula una botella con 10 mL de muestra, el sistema de incubación, agitación y los nutrientes del medio de cultivo de la botella brindan las condiciones óptimas para la activación del metabolismo microbiano. El diodo emisor de luz ilumina el sensor colorimétrico de la botella y el fotodiodo realiza lecturas de reflectancia cada 10 minutos. Al aumentar la producción del gas dentro de la botella este se permea en el LES disminuyendo el pH provocando así un cambio de color en el indicador de gris (baja reflectancia) a amarillo (alta reflectancia) aumentando las unidades de reflectancia (UR) captadas por el fotodiodo a medida que se da el cambio. (BIOMERIEUX, 2021)

Los resultados son presentados por el sistema como botellas POSITIVAS o NEGATIVAS y sus especificaciones se dan mediante una gráfica que indica las unidades de reflectancia (UR) medidas a través del tiempo. (BIOMERIEUX, 2021)

7.3 PRUEBA DE PRESENCIA

En esta prueba se evaluó la presencia de bacilo esporulado termorresistente no alterante (BETNA) durante la línea de producción de leche entera UHT y su interferencia en la detección de contaminación de manera temprana por el sistema BacT/ALERT 3D.

El BETNA es comúnmente encontrado en el microbiota de la leche UHT proveniente de la cadena de producción primaria (leche cruda) ya que contiene esporas termorresistentes que le permiten proliferar después de la pasteurización a altas temperaturas. Este microorganismo no genera alteraciones organolépticas, químicas y sensoriales al producto y NO es patógeno para el ser humano. Por lo tanto, no se considera relevante en el análisis microbiológico de los productos lácteos hasta el momento, a menos de que sea para su confirmación evitando

confusiones con microorganismos peligrosos. El BETNA no supone un riesgo para la calidad e inocuidad de la leche UHT (Vanessa, 2021).

La sensibilidad del sistema BacT/ALERT 3D no le permite discriminar la presencia de *BETNA* en las muestras inoculadas ya que este microorganismo en su metabolismo también produce pequeñas cantidades de CO₂ y esto puede solapar un agente microbiológico peligroso dentro de la muestra o llevar a la generación de falsos positivos.

Las botellas iFA Plus fueron diseñadas con el fin de limitar la proliferación de este microorganismo ya que carece de factores claves para su desarrollo como vitaminas B12 (BIOMERIEUX, 2020) lo que conlleva al desarrollo del microorganismo en unidades indetectables para el sistema hasta después de los 2,5 días de incubación según los resultados arrojados. Sin embargo, cuando la muestra fue analizada después de una preincubación o tiempo prolongado de trabajo de la envasadora, el sistema lo detecta como contaminación en menos de 1.5 días pudiéndose confundir con otro microorganismo peligroso. Es de resaltar que las gráficas de datos de unidades de reflectancia en el tiempo para *BETNA* difieren significativamente a las de un microorganismo contaminante (ver anexo 4 y 6).

7.3.1 Resultados Primer ciclo PRUEBA DE PRESENCIA

En esta prueba se empleó muestras de leche entera 1.100 mL. Las muestras que fueron ingresadas al sistema en el ciclo A (0 horas, tomadas directamente de la línea de producción) **no generaron alerta** en el sistema aún después de 4 días de incubación en el equipo. En la siembra por superficie realizada en agar BHI después de la salida de las botellas del sistema no se recuperaron colonias de microorganismos contaminantes ni de *BETNA*, ya que según pruebas adicionales para la recuperación de este tipo de microorganismo se requiere un medio preparado a componentes específicos y no crece significativamente en medio comunes como el PC o BHI (Aouadhi, 2012). La tinción gram realizada a la botella confirmó la presencia de *BETNA* sin interferencia en el sistema. (tabla 2)

Tabla 2. Resultados PRUEBA PRESENCIA.

RESULTADOS PRUEBA PRESENCIA							
ANÁLISIS		LOTE/CI CLO	ID. BOTELLAS	RESULTADOS BacT/ALERT 3D		CONFIRMACION RESULTADOS	
FECHA	HORA			PTV/NGT	T. DETECCIÓN	BHI (48 hrs)	BETNA (Gram)
0 HORAS							
24/11/2022	12:00	1/A	PS1A11	NEGATIVO	4:00	-	-
	12:02		PS2A11	NEGATIVO	4:00	NEGATIVO	POSITIVO

	11:58		PS3A11	NEGATIVO	4:00	-	-
24 HORAS							
25/11/2022	10:43	1/B	PS1B11	NEGATIVO	4:00	NEGATIVO	NEGATIVO
	10:45		PS2B11	POSITIVO BETNA	2:00	NEGATIVO	POSITIVO
	10:48		PS3B11	POSITIVO BETNA	3:27	NEGATIVO	POSITIVO
48 HORAS							
26/11/2022	11:20	1/C	PS1C11	NEGATIVO	4:00	NEGATIVO	NEGATIVO
	11:21		PS2C11	POSITIVO BETNA	2:03	NEGATIVO	POSITIVO
	11:22		PS3C11	POSITIVO BETNA	3:29	NEGATIVO	POSITIVO
-: No se realizó. Color amarillo: Resultados positivos para BETNA en el sistema.							

Fuente: Autora

7.3.2 Resultados ciclo 2 y 3 PRUEBA DE PRESENCIA.

Las botellas **PS2B11** y **PS3B11** analizadas en el equipo correspondientes a las bolsas con 24 y 48 horas de incubación a 37°C (ciclo B) fueron **positivas** después de dos días en el sistema; se les realizó tinción gran para su confirmación y los resultados fueron positivos para BETNA sin ningún contaminante de interés presente.

La botella **PS1B11** arrojó resultados negativos después de la incubación debido a que no toda la leche que pasa por un proceso UHT tiene *BETNA* ya que las esporas pudieron no resistir el calentamiento o estar ausentes en la muestra; de igual manera se le realizaron pruebas confirmativas y los resultados fueron negativos para todos los microorganismos (Chedia,2014).

Los datos obtenidos permitieron evidenciar que la incubación de las muestras por más de dos horas después del envasado generan interferencias en la veracidad de los resultados debido a la presencia de *BETNA* en la leche UHT; como alternativa se probó la refrigeración de las muestras que no podían ser procesadas en el tiempo estimado y se demostró que la refrigeración conserva la concentración del microorganismo en niveles adecuados y no detectables por el equipo en un tiempo inferior a 2,5 días lo que facilita el proceso de análisis en caso de contingencias de turnos de personal que no permitan el análisis inmediato del producto que está siendo envasado (Biomerieux, 2022).

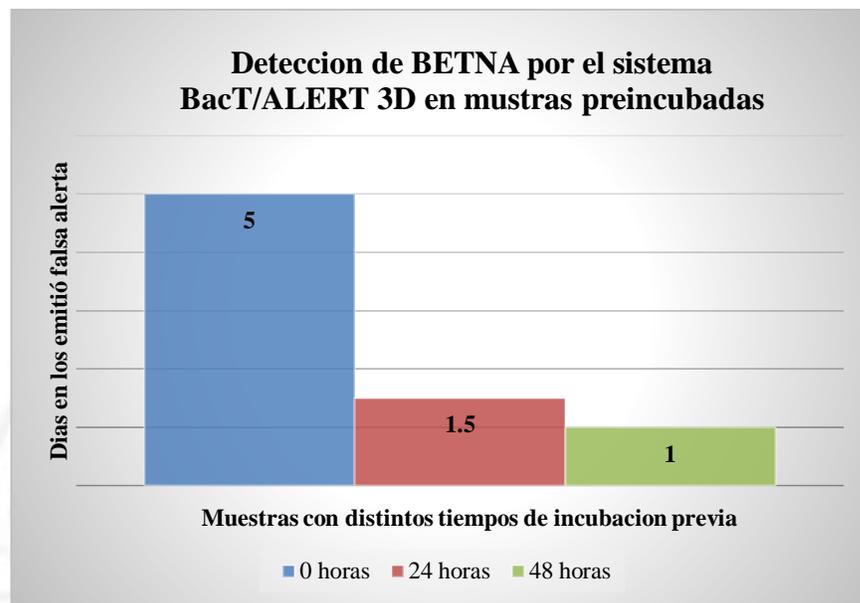


Diagrama 12. Detección de BETNA por el sistema BacT/ALERT 3D en muestras preincubadas.

Fuente: Autora

En el diagrama 12 se observa cómo entre más tiempo de preincubación tiene una muestra láctea UHT antes de ser analizada en el sistema, mayor será su interferencia con la veracidad de resultados por la presencia de BETNA. Si una muestra es evaluada en el sistema directamente de la línea de producción la carga de este microorganismo se mantendrá en niveles indetectables hasta por 4 días así pues cualquier alerta emitida en un tiempo inferior a este en muestras sin preincubar será ocasionada por un microorganismo contaminante (Biomerieux, 2022).

7.4 PRUEBA DE COMPATIBILIDAD

En esta prueba se analizaron 6 diferentes matrices lácteas UHT para evaluar si alguno de sus componentes interfería con los resultados arrojados por el sistema. Las matrices lácteas evaluadas fueron leche entera, leche semidescremada, leche deslactosada, cremas semidescremadas, leche saborizada (chocolate) y avena.

Las muestras fueron tomadas directamente de la línea de producción y montadas en el menor tiempo al sistema, los resultados negativos (*tabla 3*) arrojados por el equipo y confirmados con plaqueo en agar PC demostraron que todas las matrices fueron compatibles en el equipo y no dieron resultados inespecíficos; sin embargo los productos con aditivos o características adicionales como la avena o crema con especias, las leches con saborizantes y productos con

enzimas deben ser evaluados independientemente para su implementación en el sistema (Biomerieux, 2022).

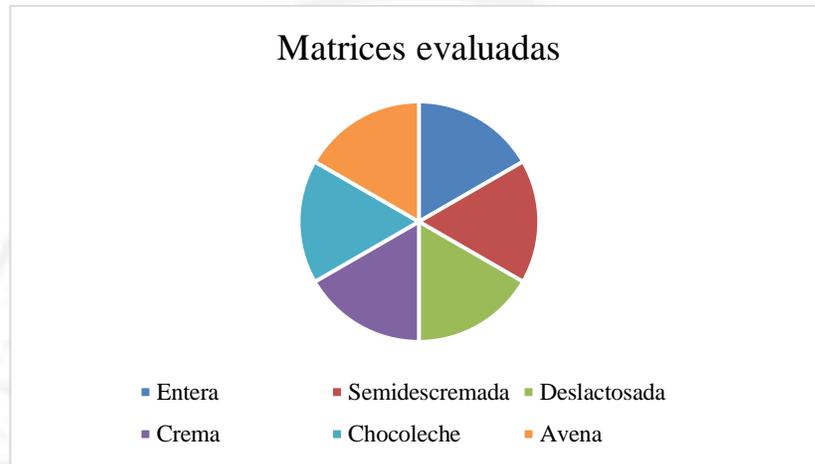


Diagrama 13. Matrices evaluadas.

Fuente: Autora

Tabla 3. Resultados PRUEBA COMPATIBILIDAD.

INFORMACIÓN PRUEBA COMPATIBILIDAD BacT/ALERT 3D									
Matriz	Fecha Análisis	Ciclo	Lote	T °C	ID.	Resultado	Tiempo detección	CONFIRMACIÓN	
								BHI (48 hrs)	PC (48 hrs)
(A) Entera	24/11/2022	A	1	29.5	COP1A11	NEGATIVO	3,63	NEGATIVO	NEGATIVO
					COP2A11	NEGATIVO	4,09	NEGATIVO	NEGATIVO
					COP3A11	NEGATIVO	4:09	-	-
					COP4A11	NEGATIVO	4:09	-	-
					COP5A11	NEGATIVO	4:09	-	-
	26/11/2022	B	2	24	COP1AB11	NEGATIVO	4:91	-	-
					COP2AB11	NEGATIVO	4:91	NEGATIVO	NEGATIVO
					COP3AB11	NEGATIVO	4:91	-	-
					COP4AB11	NEGATIVO	4:91	-	-
					COP5AB11	NEGATIVO	4:91	-	-
	28/11/2022	C	3	24	COP1AC11	NEGATIVO	4:00	NEGATIVO	NEGATIVO
					COP2AC11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP3AC11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP4AC11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP5AC11	NEGATIVO	4:00	-	-
25/11/2022	A	1	29.4	COP1B11	NEGATIVO	4:00	-	-	

(B) Leche Semidescremada					COP2B11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP3B11	NEGATIVO	4:00	NEGATIVO	NEGATIVO
					COP4B11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP5B11	NEGATIVO	4:00	-	-
	1/12/2022	B	2	23	COP1BB11	NEGATIVO	4:03	-	-
					COP2BB11	NEGATIVO	4:03	NEGATIVO	NEGATIVO
					COP3BB11	NEGATIVO	4:03	-	-
					COP4BB11	NEGATIVO	4:03	-	-
					COP5BB11	NEGATIVO	4:03	-	-
	5/12/2022	C	3	23	COP1BC11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP2BC11	NEGATIVO	4:01	-	-
					COP3BC11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP4BC11	NEGATIVO	4:00	-	-
COP5BC11					NEGATIVO	4:00	-	-	
(C) Deslactosada	26/11/2022	A	1	23	COP1C11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP2C11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP3C11	NEGATIVO	4:00	NEGATIVO	NEGATIVO
					COP4C11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP5C11	NEGATIVO	4:00	-	-
	29/11/2022	B	2	24.4	COP1CB11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP2CB11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP3CB11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP4CB11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP5CB11	NEGATIVO	4:00	NEGATIVO	NEGATIVO
	5/12/2022	C	3	23	COP1CC11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP2CC11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP3CC11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP4CC11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP5CC11	NEGATIVO	4:00	-	-
(D) Crema Semi	28/11/2022	A	1	24	COP1DA11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP2DA11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP3DA11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP4DA11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP5DA11	NEGATIVO	4:00	NEGATIVO	NEGATIVO
	1/12/2022	B	2	24	COP1DB11	NEGATIVO	4:00	NEGATIVO	NEGATIVO
					COP2DB11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP3DB11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP4DB11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP5DB11	NEGATIVO	4:00	-	-

	5/12/2022	C	3	20	COP1DC11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP2DC11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP3DC11	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP4DC11	NEGATIVO	4:00	NEGATIVO	NEGATIVO
					COP5DC11	NEGATIVO	4:00	-	-
(E) Leche saborizada	22/12/2022	A	1	13	COPEA1	NEGATIVO	4:00	-	-
					COPEA2	NEGATIVO	4:00	-	-
					COPEA3	NEGATIVO	4:00	-	-
					COPEA4	NEGATIVO	4:00	NEGATIVO	NEGATIVO
					COPEA5	NEGATIVO	4:00	-	-
	11/1/2023	B	2	20.5	COPF1E01	NEGATIVO	4:00	-	-
					COPF2E01	NEGATIVO	4:00	-	-
					COPF3E01	NEGATIVO	4:00	-	-
					COPF4E01	NEGATIVO	4:00	-	-
					COPF5E01	NEGATIVO	4:00	-	-
	19/1/2023	C	3	22	COPF1E01	NEGATIVO	4:00	-	-
					COPC2E01	NEGATIVO	4:00	-	-
					COPC3E01	NEGATIVO	4:00	-	-
					COPC4E01	NEGATIVO	4:00	-	-
COPC5E01					NEGATIVO	4:00	-	-	
(F) Avena	28/12/2022	A	1	20	COP1FA12	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP2FA12	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP3FA12	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP4FA12	NEGATIVO	4:00	NEGATIVO	NEGATIVO
					COP5FA12	NEGATIVO	4:00	-	-
	12/1/2022	B	2	20	COP1FB01	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP2FB01	NEGATIVO	4:00	NEGATIVO	NEGATIVO
					COP3FB01	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP4FB01	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP5FB01	NEGATIVO	4:00	-	-
	23/1/2022	C	3	22.5	COP1FC01	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP2FC01	NEGATIVO	4:00	-	-
					COP3FC01	NEGATIVO	4:00	NEGATIVO	NEGATIVO
					COP4FC01	NEGATIVO	4:00	-	-
COP5FC01					NEGATIVO	4:00	-	-	

Fuente: Autora

7.5 PRUEBA CATASTRÓFICA FASE I.

Se evaluaron 3 ciclos de producción de la envasadora con mayor incidencia en pérdida de esterilidad dentro de la planta teniendo en cuenta sus paradas y lavados; las muestras fueron tomadas directamente de la línea en cada muestreo evitando la generación de falsos positivos por BETNA.

7.5.1 Primer ciclo de producción

Como se observa en la **tabla 4**, no se presentaron interferencias en el análisis al equipo inicialmente. Tiempo después de que la envasadora estaba en marcha las muestras tomadas justo después de su primer lavado arrojaron resultados POSITIVO a los 3, 99 días de análisis. Se realizó tinción gran como prueba de confirmación y se hallaron células de BETNA en las muestras; por el tiempo en el que la alerta fue emitida y análisis mencionados anteriormente se confirmó que no se trataba de un microorganismo peligroso. El positivo se debe a que después de un lavado de las envasadoras las biopelículas formadas por BETNA al interior de la línea se desprenden y la carga aumenta dentro del producto, aun así, no representa un riesgo. (Vanessa, 2022)

La negatividad en los resultados de las muestras tomadas en los demás puntos del ciclo no saturó el sistema de análisis ni hubo interferentes significativos en el BacT/ALERT 3D.

Tabla 4. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE I, ciclo 1.

CATASTRÓFICA I. BacT/Alert 3D								
CICLO 1.								
HORA CICLO	MUESTRA	ANÁLISIS		T°C	ID.	RESULTADO	T. DETECCIÓN (DÍAS)	OBSERVACIONES
		FECHA	HORA ANÁLISIS					
INICIO DE PRODUCCIÓN								
0	1	13/12/2022	8:16	15	CATF1AA1	NEGATIVO	4:00	INICIO Y CONTROL AL TIEMPO
	2	13/12/2022			CATF1AA2	NEGATIVO	4:00	
	3	13/12/2022			CATF1AA3	NEGATIVO	4:00	
3	1	13/12/2022	11:19	20	CATF1AB1	NEGATIVO	4:00	
	2	13/12/2022			CATF1AB2	NEGATIVO	4:00	
	3	13/12/2022			CATF1AB3	NEGATIVO	4:00	
6	1	13/12/2022	14:22	22	CATF1AC1	NEGATIVO	4:00	
	2	13/12/2022			CATF1AC2	NEGATIVO	4:00	
	3	13/12/2022			CATF1AC3	NEGATIVO	4:00	
9	1	13/12/2022	16:46	21	CATF1AD1	NEGATIVO	4:00	
	2	13/12/2022			CATF1AD2	NEGATIVO	4:00	
	3	13/12/2022			CATF1AD3	NEGATIVO	4:00	
PARADA (LAVADO INTERMEDIO (17:48))								

9 - 12	1	14/12/2022	9:26	17	CATF1AD XE1	POSITIVO BETNA	3:99	REINICIO
	2	14/12/2022			CATF1AD XE2	NEGATIVO	4:00	
	3	14/12/2022			CATF1AD XE3	NEGATIVO	4:00	
12	1	14/12/2022	8:25	16	CATF1AE1	NEGATIVO	4:00	
	2	14/12/2022			CATF1AE2	NEGATIVO	4:00	
	3	14/12/2022			CATF1AE3	NEGATIVO	4:00	
15	1	14/12/2022	8:27	17	CATF1AF1	NEGATIVO	4:00	
	2	14/12/2022			CATF1AF2	NEGATIVO	4:00	
	3	14/12/2022			CATF1AF3	NEGATIVO	4:00	
PARADA								
15 - 18	1	14/12/2022	9:24	20	CATF1AFX G1	NEGATIVO	4:00	REINICIO
	2	14/12/2022			CATF1AFX G2	NEGATIVO	4:00	
	3	14/12/2022			CATF1AFX G3	NEGATIVO	4:00	
18	1	14/12/2022	8:57	20	CATF1AG1	NEGATIVO	4:00	
	2	14/12/2022			CATF1AG2	NEGATIVO	4:00	
	3	14/12/2022			CATF1AG3	NEGATIVO	4:00	
21	1	14/12/2022	8:58	17	CATF1AH1	NEGATIVO	4:00	
	2	14/12/2022			CATF1AH2	NEGATIVO	4:00	
	3	14/12/2022			CATF1AH3	NEGATIVO	4:00	
24	1	14/12/2022	9:04	29	CATF1AI1	NEGATIVO	4:00	REINICIO Y ÚLTIMO CONTROL CICLO 1
	2	14/12/2022			CATF1AI2	NEGATIVO	4:00	
	3	14/12/2022			CATF1AI3	NEGATIVO	4:00	

Fuente: Autora

7.5.2 Segundo ciclo de producción.

En los resultados del segundo ciclo de la prueba consignados en la tabla 5 se encontraron muestras con resultados positivos después de que las envasadoras llevaran un largo tiempo en funcionamiento sin lavados intermedios. La confirmación de los resultados demostró que se trataba de BETNA; después de largos periodos de producción la carga de los microorganismos con estas características aumenta y su probabilidad de detección en el sistema BacT/Alert aumenta, sin embargo, las alertas son generadas después de los 3 días de análisis por lo que no se considera interferencia. Estos resultados positivos se deben al tiempo que dura una envasadora produciendo y la temperatura que estas manejan más todos los nutrientes contenidos en la leche que con el paso de las horas promueve el metabolismo y crecimiento del Bacilo (Biomerieux, 2022).

Las demás muestras analizadas durante el ciclo no presentaron interferentes aun después de los 4 días de incubación en el equipo.

Tabla 5. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE I, ciclo 2.

CATASTRÓFICA I. BacT/Alert 3D								
CICLO 2.								
HORA CICLO	MUESTRA	ANÁLISIS		T°C	ID.	RESULTADO	T. DETECCIÓN	OBSERVACIONES
		FECHA	HORA ANÁLISIS					
LAVADO INTERMEDIO 8:34								
24 - 0	1	14/12/2022	11:04	31	CATF1AIXJ1	NEGATIVO	4:00	PARADA-REINICIO
	2	14/12/2022			CATF1AIXJ2	NEGATIVO	4:00	
	3	14/12/2022			CATF1AIXJ3	NEGATIVO	4:00	
0	1	14/12/2022	11:19	31	CATF1BJ1	NEGATIVO	4:00	SOLO CONTROL
	2	14/12/2022			CATF1BJ2	NEGATIVO	4:00	
	3	14/12/2022			CATF1BJ3	POSITIVO BETNA	3:35	
REINICIO PRODUCCIÓN 13:48								
3	1	14/12/2022	15:00	30	CATF1BK1X	NEGATIVO	4:00	Análisis tarde por parada.
	2	14/12/2022			CATF1BK2X	NEGATIVO	4:00	
	3	14/12/2022			CATF1BK3X	NEGATIVO	4:00	
6	1	15/12/2022	8:42	17	CATF1BL1X	NEGATIVO	4:00	
	2	15/12/2022			CATF1BL2X	NEGATIVO	4:00	
	3	15/12/2022			CATF1BL3X	NEGATIVO	4:00	
9	1	15/12/2022	8:44	16	CATF1BM1	NEGATIVO	4:00	
	2	15/12/2022			CATF1BM2	NEGATIVO	4:00	
	3	15/12/2022			CATF1BM3	NEGATIVO	4:00	
LAVADO INTERMEDIO 21:08								
12	1	15/12/2022	8:45	18	CATF1BN1	NEGATIVO	4:00	
	2	15/12/2022			CATF1BN2	NEGATIVO	4:00	
	3	15/12/2022			CATF1BN3	NEGATIVO	4:00	
15	1	15/12/2022	9:07	17	CATF1BO1	NEGATIVO	4:00	
	2	15/12/2022			CATF1BO2	NEGATIVO	4:00	
	3	15/12/2022			CATF1BO3	NEGATIVO	4:00	
18	1	15/12/2022	9:09	17	CATF1BP1	POSITIVO BETNA	3:41	
	2	15/12/2022			CATF1BP2	NEGATIVO	4:00	
	3	15/12/2022			CATF1BP3	POSITIVO BETNA	3:38	
LAVADO INTERMEDIO								

18-21	1	15/12/2022	9:16	25	CATF1BPXQ 1	NEGATIVO	4:00	
	2	15/12/2022			CATF1BPXQ 2	NEGATIVO	4:00	
	3	15/12/2022			CATF1BPXQ 3	NEGATIVO	4:00	
21	1	15/12/2022	9:11	16	CATF1BQ1	NEGATIVO	4:00	
	2	15/12/2022			CATF1BQ2	NEGATIVO	4:00	
	3	15/12/2022			CATF1BQ3	NEGATIVO	4:00	
LAVADO PRINCIPAL 8:30								
24	1	15/12/2022	11:07	16	CATF1BR1X	NEGATIVO	4:00	
	2	15/12/2022			CATF1BR2X	NEGATIVO	4:00	
	3	15/12/2022			CATF1BR3X	POSITIVO BETNA	3:32	

Fuente: Autora

7.5.3 Tercer ciclo de producción.

Durante el ciclo no hubo interferentes en el análisis excepto por una novedad de alerta arrojada en una de las muestras que fue detectada como positiva a los 0,79 y 0,53 días. De esta novedad se logró el aislamiento de una enterobacteria en una de las bolsas analizadas; la enterobacteria logró entrar a la muestra por una falla en la maquina selladora (Biomerieux, 2022).

Al final del ciclo se detectó positividad para BETNA después de los 3 días de incubación al equipo, resultado que no es relevante en la detección de contaminantes bacterianos y se cree que es por las mismas condiciones mencionadas en el ciclo anterior. Los resultados se observan en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE I, ciclo 3.

CATASTRÓFICA I. BacT/Alert 3D								
CICLO 3.								
HORA CICLO	MUESTRA	ANÁLISIS		T°C	ID.	RESULTADO	T. DETECCIÓN	OBSERVACIONES
		FECHA	HORA ANÁLISIS					
0	1	15/12/2022	15:55	29	CATF1CS1	NEGATIVO	4:00	
	2	15/12/2022			CATF1CS2	NEGATIVO	4:00	
	3	15/12/2022			CATF1CS3	NEGATIVO	4:00	
PARADA								
3	1	15/12/2022	9:03	28	CATF1CT1X	NEGATIVO	4:00	

	2	15/12/2022			CATFICT2X	NEGATIVO	4:00	
	3	15/12/2022			CATFICT3X	NEGATIVO	4:00	
LAVADO INTERMEDIO DE 22:00 A 23:00								
6	1	15/12/2022	9:04	29	CATFICU1X	NEGATIVO	4:00	
	2	15/12/2022			CATFICU2X	NEGATIVO	4:00	
	3	15/12/2022			CATFICU3X	NEGATIVO	4:00	
9	1	16/12/2022	9:11	30	CATF1CV1	NEGATIVO	4:00	
	2	16/12/2022			CATF1CV2	NEGATIVO	4:00	
	3	16/12/2022			CATF1CV3	POSITIVO (MO#)	0:79	Presunta Falla de sellado
12	1	16/12/2022	11:22	28	CATF1CW1	NEGATIVO	4:00	
	2	16/12/2022			CATF1CW2	POSITIVO (MO#)	0:53	Presunta Falla de sellado
	3	16/12/2022			CATF1CW3	NEGATIVO	4:00	
15	1	19/12/2022	11:45	11	CATF1CY1	NEGATIVO	4:00	
	2	19/12/2022			CATF1CY2	NEGATIVO	4:00	
	3	19/12/2022			CATF1CY3	NEGATIVO	4:00	
18	1	19/12/2022	11:47	10	CATF1CZ1	NEGATIVO	4:00	
	2	19/12/2022			CATF1CZ2	NEGATIVO	4:00	
	3	19/12/2022			CATF1CZ3	NEGATIVO	4:00	
21	1	19/12/2022	11:49	12	CATF1C01	NEGATIVO	4:00	
	2	19/12/2022			CATF1C02	NEGATIVO	4:00	
	3	19/12/2022			CATF1C03	NEGATIVO	4:00	
24	1	19/12/2022	11:51	10	CATF1CX1	NEGATIVO	4:00	
	2	19/12/2022			CATF1CX2	NEGATIVO	4:00	
	3	19/12/2022			CATF1CX3	NEGATIVO	4:00	
FINAL	1	19/12/2022	11:53	13	CATF1FINAL1	NEGATIVO	4:00	FINAL PRODUCCION
	2	19/12/2022			CATF1FINAL2	POSITIVO BETNA	4:15	
	3	19/12/2022			CATF1FINAL3	POSITIVO BETNA	4:13	

Fuente: Autora

Durante la aplicación de esta prueba el sistema BacT/ALERT 3D demostró eficiencia y versatilidad en el cumplimiento de los objetivos y adicionalmente, el sistema tiene la capacidad de alerta sobre las fallas de sellado en la línea de producción como se evidenció en el ciclo 3 (*tabla 6*).

7.6 PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II

En esta prueba se verificó la sensibilidad del equipo en la detección de contaminación microbiana por 4 agentes diferentes, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* y *Staphylococcus* spp. La contaminación para el análisis se realizó en muestras de leche entera UHT de 900 mL tomadas directamente de la línea con la misma hora y fecha de envasado (Biomerieux, 2022).

7.6.1 Estandarización de concentración de cepas

Con las cepas de los agentes aislados e identificados molecularmente, se realizó una estandarización de inóculos usando el patrón McFarland 2 (6×10^8 UFC/mL) y aplicando la fórmula 1 y 2 para su respectivo recuento e informe. Los resultados fueron consignados en la tabla 7.

$$\bar{x} = \frac{a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_n}{n}$$

Fórmula 2. Promedio.

Fuente: UPT, 2021

Para *B. cereus* y *P. aeruginosa* se contaminaron muestras con las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} y para *E. cloacae* y *Staphylococcus* spp las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} , ya que se encontraron las menores unidades logarítmicas con formación de células y se pudo evaluar mejor la sensibilidad de detección del equipo (Samo, 2020).

Tabla 7. Resultados estandarización inóculo de cepas, real.

ESTANDARIZACION CEPAS CATASTROFICA II (Real)							
Nota. Se estandarizó teniendo en cuenta el patrón McFarland 2							
DILUCIÓN	RECUENTO	RECUENTO (\bar{x})	INFORME UFC/mL	DILUCIÓN	RECUENTO	RECUENTO (\bar{x})	INFORME UFC/mL
<i>Bacillus cereus</i>				<i>Enterobacter cloacae</i>			
10^{-5}	188	189	1.8×10^7	10^{-6}	332	320	3.2×10^8
	184				316		
	196				312		
10^{-6}	20	24	2.4×10^7	10^{-7}	47	46	4.6×10^8
	29				51		
	23				41		
10^{-7}	3	3	3.3×10^7	10^{-8}	4	6	6.0×10^8
	3				5		

	4				9		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				<i>Staphylococcus spp</i>			
10 ⁻⁵	244	253	2.5 x 10 ⁷	10 ⁻⁶	328	303	3.0 x 10 ⁸
	228				304		
	288				276		
10 ⁻⁶	62	57	5.7 x 10 ⁷	10 ⁻⁷	43	44	4.4 x 10 ⁸
	48				49		
	61				41		
10 ⁻⁷	7	9	8.6 x 10 ⁷	10 ⁻⁸	7	9	9.3 x 10 ⁸
	9				10		
	10				11		

Fuente: Autora

7.6.3 Análisis de la prueba CATASTRÓFICA FASE II.

7.6.3.1 Soporte del análisis

Un factor principal para garantizar la calidad e inocuidad del producto terminado es el pH. En condiciones normales y adecuadas de calidad el pH de la leche UHT se encuentra entre 6.55 a 6.65, un producto contaminado se puede evidenciar por un rápido descenso del pH en un determinado tiempo que depende del agente contaminante y su concentración en el producto (Nina, 2014). Este cambio fisicoquímico se atribuye al inicio de la fermentación microbiana en el producto, pero en la mayoría de los casos notar los signos que alertan el cambio de pH como producción de gas, tarda días y pueden ser detectados una vez el producto ya se encuentra comercializado. Por lo anterior las empresas de la industria láctea tienen pérdidas millonarias por reclamos sin contar con el mayor problema que es poner en riesgo la salud pública; el detectar la contaminación en un bajo periodo de tiempo facilitaría el control del producto implicado.

7.6.3.2 Análisis de probabilidades dentro de la verificación del sistema

Para la verificación de que el sistema BacT/ALERT 3D detecte contaminación microbiana en cortos periodos de tiempo (menos de 24 horas) es necesario tener en cuenta que existen varias probabilidades que pueden interferir en la interpretación de los datos.

Al realizar un estándar de concentración de inóculo para generar un estimado de UFCs se debe tener en cuenta que al tomar 1 mL de cierta dilución se puede llegar a tener de 1 a 99 valores en la misma unidad logarítmica (BIOMERIEUX, 2018). Por ejemplo, al tomar 1 mL de la dilución 10⁻⁷ de *B. cereus* (3 ufc/mL, **tabla 9**) podemos estar tomando cualquier valor

contenido en el intervalo de 3 a 99 ya que se encuentran en las mismas unidades logarítmicas (*Log 10*); así si tomamos 1 mL para sembrar en placa por profundidad la cantidad de células puede ser diferente (en una escala de 1 a 10) a la contenida en el mililitro que agregamos a la bolsa de muestra.

Otro factor a tener en cuenta en la verificación es que al poner 1 mL del inóculo en 900 mL de muestra se realiza un efecto de super dilución 1:900 que diluirá aún más la cantidad de células en la muestra volviendo aún mayor el reto de detección para el equipo; por esta razón puede que el volumen de los 10 mL de muestra analizados por el equipo tenga muy baja presencia de células contaminantes hasta probablemente ser nulo (BIOMERIEUX en conjunto con autora, 2022)

Para la interpretación de resultados se debe ir de la mano con las probabilidades que se mencionan anteriormente y adicionalmente la eficiencia en la capacidad de recuperación del medio de cultivo en el que se realizó el estándar (BHI).

7.6.3.3 Discusión resultados prueba CATASTROFICA fase II

En la tabla 9 se consignan los resultados generales de la prueba en donde se observa la sensibilidad de detección del equipo en todas las muestras. Los resultados negativos se atribuyeron a las probabilidades mencionadas anteriormente (Biomerieux, 2022).

Tabla 7. Relación UFCs inoculadas detección por el sistema.

RELACIÓN UFCs INOCULADAS Y DETECCION						
Microorganismo	Dilución	Recuento UFC/mL en placa (\bar{x})	Células teóricas para detección por el sistema (aproximado)	Detección de CO ₂ por el equipo	Tiempo de detección (días)	Informe del estándar
<i>B. cereus</i>	10 ⁻⁵	189	2	POSITIVO	0,43	1.8 x 10 ⁷
	10 ⁻⁶	24	1	NEGATIVO	2,00	2.4 x 10 ⁷
	10 ⁻⁷	3	1	NEGATIVO	2,00	3.3 x 10 ⁷
<i>P. aeruginosa</i>	10 ⁻⁵	253	3	POSITIVO	0,63	2.5 x 10 ⁷
	10 ⁻⁶	57	1	POSITIVO	0,70	5.7 x 10 ⁷
	10 ⁻⁷	9	1	POSITIVO	0,72	8.6 x 10 ⁷
<i>E. cloacae</i>	10 ⁻⁶	320	4	POSITIVO	0,56	3.2 x 10 ⁸
	10 ⁻⁷	46	1	POSITIVO	0,60	4.6 x 10 ⁸

	10 ⁻⁸	6	1	NEGATIVO	2,00	6.0 x 10 ⁸
<i>Staphylococcus spp.</i>	10 ⁻⁶	303	3	POSITIVO	0,78	3.0 x 10 ⁸
	10 ⁻⁷	44	1	POSITIVO	0,77	4.4 x 10 ⁸
	10 ⁻⁸	9	1	POSITIVO	0,78	9.3 x 10 ⁸

Fuente: Autora

Para *B. cereus* las muestras a las analizadas con 0 horas de incubación inoculadas con 3 a 30 células/mL los resultados fueron negativos posiblemente por las distintas probabilidades mencionadas al inicio del apartado en especial que no se logró captar 1 célula al momento de tomar los 10 mL para la inoculación en las botellas por el efecto super dilución en la muestra. El resultado positivo arrojado después de la incubación a ambiente se confirmó para microorganismos de carácter BETNA. La muestra inoculada con alrededor de 300 células/mL y analizada con 0 horas de incubación dio positivo ya que al inocular una mayor cantidad de células hay más probabilidades de captación en la toma de muestras (Biomerieux, 2022).

$$\text{UFCs analizadas: } \frac{\bar{x}}{V.\text{muestra}} (V.\text{analizado})$$

Formula 3. UFCs presentes en el análisis (aproximado).

Fuente: BIOMERIEUX, 2022

X: Promedio recuento de UFCs en placa

Con la aplicación de la fórmula 3 se demostró que el equipo puede detectar alrededor de 2 células/ 900 mL de muestra en un tiempo igual a 0,43 días. Pese a la presencia del microorganismo en la muestra el pH se mantuvo dentro de los parámetros sin evidencia de contaminación hasta la generación de alerta por el sistema (Biomerieux, 2022).

Tabla 8. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II, *B. cereus*.

PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II, <i>B. cereus</i> .								
CICLO	T °C	RECuento		ID.	RESULTADO	TIEMPO DE TECCION	pH (24 hrs)	PLAQUEADO
		DILUCION	\bar{X}					
<i>Bacillus cereus</i>								
A (0 hrs)	AMBIENTE	10 ⁻⁵	189	CERBOL-5A1	POSITIVO	0:43	-	CONFIRMADO

B (24 hrs)	(20 +/-2)	10 ⁻⁶	24	CERBOL-6A1	NEGATIVO	2:00		-
		10 ⁻⁷	3	CERBOL-7A1	NEGATIVO	2:00		CONFIRMADO
		10 ⁻⁵	189	CERBOL-5A2	POSITIVO	0:15	6.55	-
		10 ⁻⁶	24	CERBOL-6A2	POSITIVO	0:17	6.59	-
		10 ⁻⁷	3	CERBOL-7A2	POSITIVO	0:22	6.61	CONFIRMADO

Fuente: Autora

La sensibilidad del equipo para *P. aeruginosa* (*tabla 11*) logró la detección hasta 1 célula/900mL en un tiempo de 0,72 días. Todas las muestras inoculadas dieron resultados positivos sin preincubar en menos de 1 día; a medida que aumentó la concentración inoculada el equipo detectó la presencia del microorganismo en un tiempo menor ya que la producción de CO₂ fue mayor respecto a la cantidad de células que se iban formando. Por la baja concentración del microorganismo en la muestra y el poco tiempo de incubación, el pH no se vio alterado y aun así el equipo detectó el microorganismo antes de evidencia organoléptica. Al igual que con *B. cereus* todos los resultados fueron confirmados por plaqueo y tinción gran (Biomerieux, 2022).

Tabla 9. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II, *P. aeruginosa*.

PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II, <i>P. aeruginosa</i> .								
CICLO	T °C	RECuento		ID.	RESULTADO	TIEMPO DETECCIÓN	pH (24 hrs)	PLAQUEADO
		DILUCIÓN	\bar{X}					
<i>Pseudomona aeruginosa</i>								
A (0 hrs)	AMBIENTE (20 +/-2)	10 ⁻⁵	253	PSBOL-5A1	POSITIVO	0:63	6.66	-
		10 ⁻⁶	57	PSBOL-6A1	POSITIVO	0:70		-
		10 ⁻⁷	9	PSBOL-7A1	POSITIVO	0:72		CONFIRMADO
B (24 hrs)	AMBIENTE (20 +/-2)	10 ⁻⁵	253	PSBOL-5A2	POSITIVO	0:29	6.61	-
		10 ⁻⁶	57	PSBOL-6A2	POSITIVO	0:37	6.62	-
		10 ⁻⁷	9	PSBOL-7A2	POSITIVO	0:42	6.63	CONFIRMADO

Fuente: Autora

Se detectó al menos 1 células/900 mL aproximadamente de *E. cloacae* (*tabla 12*) en un tiempo de 0,60 días en muestras sin preincubar. El resultado negativo es atribuido a las mismas condiciones de super dilución que no permitieron captar las células inoculadas para el montaje de la muestra en el equipo y se confirmó esta probabilidad con el análisis de la muestra 24 horas después a temperatura ambiente siendo detectada positiva por el equipo y

en la confirmación mediante plaqueo y tinción gram se evidenció su presencia (Biomerieux, 2022).

Tabla 10. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II. *E. cloacae*.

PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II, <i>E. cloacae</i> .								
CICLO	T °C	RECuento		ID.	RESULTADO	TIEMPO DETECCIÓN	pH (24 hrs)	PLAQUEADO
		DILUCIÓN	\bar{X}					
<i>Enterobacter cloacae</i>								
A (0 hrs)	AMBIENTE (20 +/-2)	10 ⁻⁶	320	ENTBOL-6A1	POSITIVO	0:56	6.65	CONFIRMAD
		10 ⁻⁷	46	ENTBOL-7A1	POSITIVO	0:60		-
		10 ⁻⁸	6	ENTBOL-8A1	NEGATIVO	2:00		CONFIRMADO
B (24 hrs)		10 ⁻⁶	320	ENTBOL-6A2	POSITIVO	0:17	6.64	-
		10 ⁻⁷	46	ENTBOL-7A2	POSITIVO	0:20	6.65	-
		10 ⁻⁸	6	ENTBOL-8A2	POSITIVO	0:18	6.61	CONFIRMADO

Fuente: Autora

Staphylococcus spp fue detectado por al menos 1 célula/900 mL aproximadamente (tabla 13) en un tiempo de 0,78 días; también se detectó CO₂ en todas las muestras inoculadas independientemente de la dilución. A medida que la concentración de células disminuyó en la muestra el tiempo de detección del sistema aumentó. El pH no tuvo afectaciones que alertarán de la contaminación (Biomerieux, 2022).

Tabla 11. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II, *Staphylococcus spp*.

PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II, <i>Staphylococcus spp</i> .								
CICLO	T °C	RECuento		ID.	RESULTADO	TIEMPO DETECCIÓN	pH (24 hrs)	PLAQUEADO
		DILUCIÓN	\bar{X}					
<i>Staphylococcus spp</i>								
A (0 hrs)	AMBIENTE (20 +/-2)	10 ⁻⁶	303	STABOL-6A1	POSITIVO	0:78	6.63	-
		10 ⁻⁷	44	STABOL-7A1	POSITIVO	0:77		-
		10 ⁻⁸	9	STABOL-8A1	POSITIVO	0:78		CONFIRMADO
B (24 hrs)		10 ⁻⁶	303	STABOL-6A2	POSITIVO	0:57	6.62	-
		10 ⁻⁷	44	STABOL-7A2	POSITIVO	0:55	6.60	-
		10 ⁻⁸	9	STABOL-8A2	POSITIVO	0:59	6.60	CONFIRMADO

Fuente: Autora

La botella inoculada con la muestra control directamente tomada de la línea dio resultados negativos después de los 2 días en el sistema y el pH se mantuvo constante. Después de 24 horas de mantenerse a temperaturas ambiente las botellas inoculadas fueron positivas a los 0,53 días y en la tinción se comprobó que se debe a la presencia de BETNA confirmando la interferencia que tiene este microorganismo con la detección (Biomérieux, 2022).

Tabla 12. Resultados PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II, Control de bolsas.

PRUEBA CATASTRÓFICA FASE II, Control de bolsas.						
CICLO	T °C	ID.	RESULTADO	TIEMPO DETECCIÓN	pH (24 hrs)	PLAQUEADO
CONTROL BOLSAS						
A (0 hrs)	AMBIENTE (20 +/-2)	CONTA CAT 2	NEGATIVO	2:00	6.62	-
B (24 hrs)		CONTB CAT 2	POSITIVO	0:53	6.60	BETNA

Fuente: Autora

7.7. Estudios relacionados con el sistema BacT/Alert 3D

Este sistema fue inicialmente aplicado en análisis clínicos en pruebas para recuperación de micobacterias como *Mycobacterium tuberculosis* (K.A.K,2003) en donde se hace uso de la detección el equipo para captar las micobacterias de esta especie que resisten a tratamiento con fármacos dando resultados de rápida detección y recuperación de células.

En otros estudios realizados por Francesco Congestrìa y colaboradores se comparó el tiempo de detección de bacteriemia y fungemia del sistema BacT/Alert 3D con otros sistemas de detección rápida con agentes como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *E.coli*. Los resultados favorecieron al sistema VIRTUO también de la misma multinacional con un menor tiempo de detección (Fancesco, 2017).

También se ha empleado en el análisis de microorganismos exigentes como *Neisseria meningitidis*, especies de *Haemophilus* y *Corynebacterium* con diferentes tiempos y condiciones de preincubación en cultivos de sangre (Miriam, 2009).

7.8 Complemento

Adicional a las pruebas aplicadas en la evaluación del funcionamiento del sistema BacT/ALERT 3D durante la pasantía se realizaron pruebas de cotidianidad en el análisis de lácteos y todo lo relacionado con el sello de garantía de resultados en cada protocolo. Se evaluó la calibración de equipos de laboratorio, se realizaron análisis de muestras de ambientes, manipuladores, productos como leche cruda, arequipe, cremas y todo lo relacionado con la planta, materia prima, caracterización de patógenos, evaluación de microorganismos relacionados con la pérdida de esterilidad en los procesos, entre otros.

8. CONCLUSIONES

Al evaluar el sistema BacT/ALERT 3D para la detección rápida de contaminantes microbianos en productos UHT se determinó que el BETNA **presente** comúnmente en alimentos lácteos con esta condición, no genera interferencias con el análisis en un tiempo inferior a 2,5 días, siempre y cuando las muestras ingresadas al equipo no tengan incubación previa y sean analizadas en el menor tiempo posible.

Las diferentes matrices UHT evaluadas (avena, leche entera, leches semidescremadas, crema, leche saborizada chocolate), demostraron **compatibilidad** con el sistema y que ninguno de sus aditivos o característica físico químicas afectan con la generación de resultados confiables por el equipo BacT/ALERT 3D.

El análisis de una línea de producción larga en una planta de gran producción no afecta la veracidad de los resultados arrojados por el equipo **ni satura el sistema**. Si los ciclos de producción son muy extensos, *BETNA* puede llevar a la generación de falsos positivos en los finales de línea o tiempo después de los lavados por el posible desprendimiento de biopelículas.

El sistema BacT/ALERT 3D demostró efectividad en el objetivo de **detectar** el CO₂ producido por microorganismos contaminación en alimentos lácteos UHT con sensibilidad de captación de al menos 1 células/10 mL de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp*, *Enterobacter cloacae* y 2 células/10 mL *Bacillus cereus* en un tiempo inferior a 24 horas de análisis y sin interferencias del microorganismo *BETNA* de hábitat común en estos productos.

El equipo se encuentra evaluado y verificado ya que sus resultados superaron de manera satisfactoria los objetivos planteados y está listo para continuar con la traza de implementación en la planta láctea de Bogotá, Cundinamarca.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda trabajar el equipo en un tiempo máximo de incubación de 2 días para evitar interferencias del bacilo esporulado termorresistente no alterante en los análisis y se recalca la importancia de analizar muestras sin incubación previa (salidas directamente de la línea de producción o en refrigeración).

Al implementar el equipo en el análisis de una nueva matriz o producto se recomienda aplicar nuevamente la evaluación de compatibilidad ya que las fórmulas y aditivos de cada alimento son diferentes.

Al aumentar el número de muestras analizadas por el sistema se debe ampliar su capacidad de incubación añadiendo los cubículos necesarios.

El ajuste de periodos más cortos de producción entre lavados aumentará la eficiencia y diagnóstico de sistema discriminando las posibles biopelículas formadas por *BETNA*.

Si hay microorganismos específicos diferentes a los evaluados que sean causa de pérdidas de esterilidad en plantas en donde se quiera implementar el sistema se recomienda la aplicación de la prueba catastrófica fase II para evaluar el comportamiento del microorganismo respecto a la detección.

10. REFERENCIAS

Aouadhi, H. Simonin, H. Prévost, M. de Lamballerie, A. Maaroufi, S. Mejri, (2012). Optimization of pressure-induced germination of *Bacillus sporothermodurans* spores in water and milk, Food Microbiology, Volume 30, Issue 1, Pages 1-7, Consultado el día 29 de mayo del año 2023 de, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.006>.

Acosta, A., Galetto, A., Valdés, A. y Londinsky, A. (2022). Más allá de la finca lechera - Enmarcando el diálogo de política lechera en América Latina. Rome, FAO y FEPALE. Consultado el día 26 de septiembre del año 2022 de, <https://doi.org/10.4060/cc2188es>

BIOMEIEUX. (2021) Manual del usuario - 514820-1es2 - 2021-06 - es - bactalert 3d dualt - b.50.pdf. Consultado el día 10 de enero del año 2023 de, <https://resourcecenter.biomerieux.com/shared/mjm5mdy2nziwlfvzzxigtwfwfudwfsic0gnte0odiwlfffjiglsaymdixlta2ic0gzw4glsbcywnuquxfuqgm0qgrvhvbfqglsbcljuwlnbkzixvtq==>

BIOMERIEUX. (2022). Descripción general de los sistemas de detección microbiana 3D BACT/ALERT. España. Consultado el día 27 de mayo del 2023 de, <https://www.biomerieux-diagnostics.com/bact-alert-3d-microbial-detection-systems-overview>

Carrillo, Leonor, M; Audidio Carina; Bejarano Noemí V; Gómez M. Silvia; Ancasi E. Gustavo y Benítez Ahrendts Marcelo R. (2007). MANUAL DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS. Edición 1. Capítulo 14. Leche y derivados. Argentina. Consultado el día 03 de noviembre del 2022 de, <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/14%20leche%20y%20derivados.pdf>

CDC. Centro De Control Y Prevención De Enfermedades. (2021). Brote de Listeria vinculado a queso fresco fabricado por El Abuelito Cheese Inc. EE.UU. Consultado el día 21 de diciembre del 2022 de, <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/hispanic-soft-cheese-02-21/esp/#print>

CENTRO PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES (CDC). (2009). Brote en varios estados de infecciones por E. coli O157:H7 asociadas al consumo de masa cruda para galletas preenvasadas y refrigeradas. EE.UU. Consultado el día 16 de diciembre del 2022 de, <https://www.cdc.gov/ecoli/es/2009/0630.html>

Chedia Aouadhi, Zeineb Rouissi, Slah Mejri, Abderrazak Maaroufi, 2014, Inactivation of *Bacillus sporothermodurans* spores by nisin and temperature studied by design of

experiments in water and milk, *Food Microbiology*, Volume 38, Pages 270-275, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.005>.

CNA. DANE. (2014). Tercer Censo Nacional Agropecuario. Consultado el 24 de septiembre del año 2022 de, <https://microdatos.dane.gov.co/catalog/513/study-description>

Davor Daniloski, Noel A. McCarthy, Tatijana Markoska, Martin J. Auld, Todor Vasiljevic, (2022). Conformational and physicochemical characteristics of bovine skim milk obtained from cows with different genetic variants of β -casein, *Food Hydrocolloids*, Volume 124, Part A, , 107186, ISSN 0268-005X. Consultado el 26 de septiembre del año 2022 de, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107186>.

DECRETO 616. Ministerio de Protección Social. (2006). Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendia, importe o exporte en el país. Colombia. Consultado el día 30 de noviembre del 2022 de, <https://www.ica.gov.co/getattachment/15425e0f-81fb-4111-b215-63e61e9e9130/2006d616.aspx>

Diaz Y. Ismael. Alimentos con historia. (2013). LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. UNED. España. Consultado el día 15 de noviembre del 2022 de, https://www.mapa.gob.es/ca/megustalaleche/estudios-e-informes/1365434231_Leche_y_productos_lacteos_126_pag_058-066_yubero_tcm34-213358.pdf

Erkmen Osman, Practice 31 - Analysis of milk and milk products, Editor(s): Osman Erkmen, *Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments*, Academic Press, (2022), Pages 327-349, ISBN 9780323916516. Consultado el día 28 de septiembre del año 2022 de, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91651-6.00027-6>.

FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. (2013), El sector lechero mundial: Datos. EEUU. Consultado el 22 de septiembre del año 2022 de, <http://www.dairydeclaration.org/Portals/153/FAO-Global-Facts-SPANISH-F.PDF?v=1>

Francesco Congestrì, Maria Federica Pedna, Michela Fantini, Michela Samuelli, Pasqua Schiavone, Arianna Torri, Stefania Bertini, Vittorio Sambri, 2017. Comparison of 'time to detection' values between BacT/ALERT VIRTUO and BacT/ALERT 3D instruments for clinical blood culture samples, *International Journal of Infectious Diseases*, Volume 62,

Pages 1-5, Consultado el día 05 de mayo del 2023 de, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.06.012>.

Hilton C. Deeth, Heat Treatment of Milk: Extended Shelf-Life (ESL) and Ultra-High Temperature (UHT) Treatments☆, Editor(s): Paul L.H. McSweeney, John P. McNamara, Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition), Academic Press, 2022, Pages 618-631, ISBN 9780128187678, Consultado el día 15 de noviembre del 2022 de, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00140-9>.

K.A.K. Ängeby, J. Werngren, J.C. Toro, G. Hedström, B. Petrini, S.E. Hoffner, 2003, Evaluation of the BacT/ALERT 3D system for recovery and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis, Clinical Microbiology and Infection, Volume 9, Issue 11, Pages 1148-1152, Consultado el día 07 de mayo del 2023 de, <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00783.x>.

Konrad J. Domig, Ulrike Zitz, Sonja Macher, Alois Kronberger, Andreas Reiter, Wolfgang Kneifel, Selective colorimetric detection of Gram-negative re-contaminants in pasteurised milk products by a novel application of the BacT/ALERT 3D system, International Dairy Journal, Volume 29, Issue 1, 2013, Pages 21-27, ISSN 0958-6946, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.10.003>.

López, A.L.; Barriga, D. La leche, composición y características. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, (2016). 34 p. Formato digital (e-book) - (Tecnología, Postcosecha e Industria Agroalimentaria). Consultado el día 03 de octubre del año 2022 de, <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/registro-servifapa/436502c6-f47c-42ab-a053-f3ab26dee712>

Luna, Jaime. (2014). Evaluación de riesgos microbiológicos: *Bacillus sporothermodurans* en leche UHT. Consultado el día 02 de enero del año 2023 de, <http://hdl.handle.net/20.500.12010/4928>.

MERCK; MILLIPORE. MXQREAD01. (2020). Milliflex® Quantum Rapid Detection System. An easy-to-use, non-destructive, fluorescent staining-based system for faster microbial detection. Alemania. Consultado el día 30 de noviembre del 2022 de, <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/140/104/milliflex-quantum-rapid-detection-system-ds6073en-mk.pdf>

MINISTERIO DE SALUD. ABECÉ de la inocuidad de alimentos. Mininformativo. (2017). Colombia. Consultado el día 21 de diciembre del año 2022 de,

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SNA/abc-inocuidad.pdf>

Miriam C. Wilms, Sven Stanzel, Ralf R. Reinert, Irene Burckhardt, 2009, Effects of preincubation temperature on the detection of fastidious organisms in delayed-entry samples in the BacT/ALERT 3D blood culture system, *Journal of Microbiological Methods*, Volume 79, Issue 2, Pages 194-198, Consultado el día 05 de mayo del 2023 e, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.08.015>.

Nina Bilandžić, Đurđica Božić, Maja Đokić, Marija Sedak, Božica Solomun Kolanović, Ivana Varenina, Sanin Tanković, Željko Cvetnić, 2014. Seasonal effect on aflatoxin M1 contamination in raw and UHT milk from Croatia, *Food Control*, Volume 40, Pages 260-264, Consultado el día 28 de mayo del año 2023 de, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.002>.

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA. NTC-ISO 22000. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Calificación; ICONTEC. (2005). Sistema de Gestión de Inocuidad de los Alimentos. Requisitos Para Cualquier Organización de la Cadena Alimentaria. Colombia. Consultado el día 03 de diciembre del 2022 de, <https://drive.google.com/drive/u/0/folders/19pxxl2pVhSIVMKCUX1K211lqtREv-Bxi>

NORMA TÉCNICA ANDINA 16 007. Sistema Andino de Calidad. (2007). Establece los requisitos que deben cumplir las leches fermentadas, destinadas al consumo humano directo. Consultado el día 09 de diciembre del 2022 de, https://www.midagri.gob.pe/portal/download/pdf/direccionesyoficinas/dgca/normatividad-lacteos/Normas_Andinas/PNA_Leches_Fermentadas_16007.pdf

NORMA TÉCNICA ANDINA 16 006. Sistema Andino de Calidad. (2007). Establece los requisitos que debe cumplir la leche fluida con ingredientes destinados al consumo humano. Consultado el día 09 de diciembre del 2022 de, <https://mail.google.com/mail/u/0/?tab=rm&ogbl#chat/dm/56X0ZEAAAAE>

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 1419. ICONTEC. (2004). Productos lácteos. Leche Líquida Saborizada. Colombia. Consultada el día 09 de diciembre del 2022 de, <https://drive.google.com/drive/u/0/folders/19pxxl2pVhSIVMKCUX1K211lqtREv-Bxi>

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 4433. ICONTEC. (2006). Método Para Evaluar La Esterilidad Comercial. Colombia. Consultado el día 16 de diciembre del 2022 de, <https://mail.google.com/mail/u/0/?tab=rm&ogbl#chat/dm/56X0ZEAAAAE>

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 930. ICONTEC. (2006). Productos lácteos. Crema De Leche. Colombia. Consultado el día 16 de diciembre del 2022 de, <https://drive.google.com/drive/u/0/folders/19pxxl2pVhSIVMKCUX1K211lqtREv-Bxi>

OCDE-FAO. (2020), OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2020-2029, OECD. Consultado el 22 de septiembre del año 2022 de, <https://doi.org/10.1787/a0848ac0-es>

OMS, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2015). Las primeras estimaciones mundiales de la OMS sobre enfermedades transmitidas por los alimentos revelan que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes. Suiza. Consultado el día 15 de noviembre del 2022 de, <https://www.who.int/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>

ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE NORMALIZACIÓN. Norma Técnica colombiana (2005). Requisitos para cualquier organización en la cadena alimentaria. Guía de responsabilidad social. ISO 22000, Consultada el día 03 de noviembre del año 2022 de, <https://agroindustriaalimentariaandes.files.wordpress.com/2018/03/norma-tecnica-colombiana-iso-220002.pdf>

Ospina Martínez M. Lucia; Grupo Gestión del Riesgo y Respuesta Inmediata. Ministerio de Salud y Protección Social. Instituto Nacional de Salud. (2022). Protocolo de Vigilancia de Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Colombia. Consultado el día 21 de noviembre del 2022 de, https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/Pro_ETA%202022.pdf#search=BROTOS%20POR%20LACTEOS

Ospina Martínez M. Lucia; Grupo Gestión del Riesgo y Respuesta Inmediata. Ministerio de Salud y Protección Social. Instituto Nacional De Salud. (2019). Informe de evento. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS. Periodo epidemiológico III. Colombia. Consultado el día 21 de noviembre del 2022 de, <https://www.ins.gov.co/buscador/Informesdeevento/ENFERMEDAD%20TRANSMITIDA%20POR%20ALIMENTOS%20PE%20III%202019.pdf#search=BROTOS%20POR%20LACTEOS>

Peris V. Juan; Carda B. Samuel; Esteve R. Josep. Validation of Rapid Microbiological Methods, SLAS Technology, Volume 20, Issue 3, 2015, Pages 259-264, ISSN 2472-6303, Consultado el día 15 de noviembre del 2022 de, <https://doi.org/10.1177/2211068214554612>.

Pereira P. Vanessa; Cezar de Campos Ferreira A, Cotta M. Alonso, Kabuki D. Yorika, Influence of milk proteins on the adhesion and formation of *Bacillus sporothermodurans* biofilms: Implications for dairy industrial processing, Food Control, Volume 134, (2022), 108743, ISSN 0956-7135. Consultado el día 30 de septiembre del año 2022 de, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108743>.

Ponce de León-García, L., (2007). El Codex Alimentarius y la reglamentación internacional para la evaluación de la inocuidad de alimentos obtenidos de plantas genéticamente modificadas. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 6(1),1-9. [fecha de Consulta 15 de diciembre de 2022]. ISSN: 1665-2738. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62060101>

Ramos, GL, Nascimento, JD, Margalho, LP, Duarte, MC, Esmerino, EA, Freitas, MQ, Cruz, AG y Sant'Ana, AS (2021). Evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico en productos lácteos: Conceptos y aplicaciones. *Tendencias en ciencia y tecnología de los alimentos*, 111 , 610-616.

RESOLUCIÓN 2115. Ministerio de protección social. (2007). Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. Colombia. Consultado el día 03 de diciembre del 2022 de, http://aplicacionespruebas.ins.gov.co/Sivicap_Web/Anexos/Resoluciones/Resolucion2115de2007.pdf

RESOLUCION 2674. Ministerio de Protección Social. (2013). Por la cual se reglamenta el artículo 126 del Decreto Ley 019 de 2012 y se dictan otras disposiciones. Colombia. Consultado el día 03 de diciembre del 2022 de, <https://www.suin-juriscol.gov.co/viewDocument.asp?id=30033811>

RESOLUCIÓN 1407. Ministerio de Salud y Protección Social. (2022). Por la cual se establecen los criterios microbiológicos que deben cumplir los alimentos y bebidas destinados para consumo humano. Colombia. Consultado el día 06 de diciembre del 2022 de, <https://drive.google.com/drive/u/0/folders/19pxxl2pVhSIVMKCUX1K211lqtREv-Bxi>

RESOLUCIÓN 2195. Ministerio de Protección Social. (2010). por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos que se deben cumplir durante el proceso térmico de alimentos envasados herméticamente de baja acidez y acidificados, que se fabriquen, transporten, expendan, distribuyan, importen, exporten y comercialicen para el consumo

humano. Colombia. Consultado el día 09 de diciembre del mes 2022 de, <https://drive.google.com/drive/u/0/folders/19pxxl2pVhSIVMKCUX1K211lqtREv-Bxi>

RESOLUCION 3619. (2013). Ministerio de Protección Social. Por el cual se expide el Manual de Buenas Prácticas del Laboratorio de Control de calidad de productos farmacéuticos, se establece la guía de evaluación y se dictan otras disposiciones. Colombia. Consultado el día 02 de enero del año 2023 de, https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%203619%20de%202013.pdf

Rosenberg M, UHT Sterilized Milks, Editor(s): Paul L.H. McSweeney, John P. McNamara, Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition), Academic Press, 2022, Pages 477-488, ISBN 9780128187678, Consultado el día 03 de noviembre del 2022 de, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00118-5>.

Samo Jeverica, Faten El Sayed, Petra Čamernik, Boštjan Kocjančič, Boštjan Sluga, Martin Rottman, (2020). Lea Papst, Growth detection of Cutibacterium acnes from orthopaedic implant associated infections in anaerobic bottles from BACTEC and BacT/ALERT blood culture systems and comparison with conventional culture media, Anaerobe, Volume 61, 102133, ISSN 1075-9964, Recuperado el día 27 de mayo del 2023 de, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102133>.

Simpson R. Ricardo, Jiménez P; Maite, Vega F, Mauricio, Romero M, Alejandro, & Costa L., Marcia. (2000). Evaluación de leches UHT comerciales y optimización del proceso industrial. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(4), 353-360. Recuperado en 30 de noviembre de 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222000000400006&lng=es&tlng=es.

Troncoso A. Humberto (2014). *Entorno Ganadero N° 44. Producción de leche y síntesis*. Argentina. BM Editores. Depto. de Nutrición Animal y Bioquímica, FMVZ, UNAM. consultado el día 28 de diciembre del año 2022 de, https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/leche_subproductos/59-Produccion_Leche_y_Biosintesis.pdf

UPRA. MINISTERIO DE AGRICULTURA COLOMBIANA. (2020). Cadena láctea colombiana. Análisis situacional cadena láctea. Consultado el día 24 de septiembre del año 2022 de, https://www.andi.com.co/Uploads/20200430_DT_AnalSitLecheLarga_AndreaGonzalez.pdf

Vanessa Pereira Perez Alonso, Jéssica de Oliveira Morais, Dirce Yorika Kabuki, (2021). Incidence of *Bacillus cereus*, *Bacillus sporothermodurans* and *Geobacillus stearothermophilus* in ultra high temperature milk and biofilm formation capacity of isolates, International Journal of Food Microbiology, Volume 354, Consultado el día 28 de mayo del 2023 de, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109318>.

