

**MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS DE REFERENCIA PARA EL
CONTROL DE CALIDAD DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

NEIDER ALFONSO JIMÉNEZ MIRANDA
COD: 1094274105

TRABAJO DE GRADO PRÁCTICA PASANTÍA

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2018

**MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS DE REFERENCIA PARA EL
CONTROL DE CALIDAD DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

**NEIDER ALFONSO JIMÉNEZ MIRANDA
COD: 1094274105**

TRABAJO DE GRADO PRÁCTICA PASANTÍA

**TUTOR LABORAL
Ana María Rivera Barrios Nuevos - Carol Rocío Buitrago Rozo**

**TUTOR ACADÉMICO
Alba Ricardo Páez**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PAMPLONA
2018**

NOTA DE ACEPTACIÓN

TUTOR ACADÉMICO
Alba Ricardo Paéz

JURADO
William Hernando Suarez Quintana

JURADO
Claudia Marina Clavijo Olmos

PAMPLONA, 14 de JUNIO 2018

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

1.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

2. JUSTIFICACIÓN

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 MARCO LEGAL

3.2 SISTEMA TEÓRICO

4. METODOLOGÍA

4.1 Cepas de Referencia

4.2 Activación de las cepas

4.3 Requerimientos de cultivo y crecimiento para las cepas.

4.4 Mantenimiento y conservación de las cepas de referencia.

4.4.1 Mantenimiento y conservación Cepa Madre.

4.4.2 Mantenimiento y conservación Cepa de Reserva y de Trabajo

4.5 Viabilidad de las cepas

4.6 Control de Calidad de los Métodos de Análisis del Laboratorio

4.6.1 Control de Calidad ReadyCult Coliforms 100

4.6.2 Control de Calidad PETRIFILM 3M E. coli/Coliformes

4.6.3 Control de Calidad Staph Express PETRIFILM 3M

4.6.4 Agar BACARA recuento en placa Bacillus cereus

4.6.5 Control de Calidad Aerobic Count Plate PETRIFILM 3M

4.6.6 Control de Calidad Detección Listeria monocytogenes. VIDAS - LMX bioMérieux

4.6.7 Control de Calidad Detección Salmonella spp. VIDAS - APE bioMérieux

4.7 Evaluación de la esterilidad de los medios de cultivo

4.8 Evaluación de la productividad cualitativa de los métodos de análisis

4.9 Evaluación de la selectividad de los métodos de análisis.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 Activación de las Cepas

6.2 Viabilidad y Pureza de las Cepas

6.3 Pureza de las cepas

6.4 Control de Calidad de los Métodos de Análisis del Laboratorio

6.4.1 Evaluación de la Esterilidad

6.4.2 Verificación Métodos de Análisis y Medios de Cultivo

6.4.3 Evaluación Cualitativa de la Productividad y Selectividad de los Métodos de análisis.

6.4.3.1 Control de Calidad Readycult Coliforms 100

6.4.3.2 Control de Calidad PETRIFILM 3M E. coli/Coliformes

6.4.3.3 Control de Calidad Staph Express PETRIFILM 3M

6.4.3.4 Agar BACARA bioMérieux recuento en placa Bacillus cereus

6.4.3.5 Control de Calidad Aerobic Count Plate PETRIFILM 3M

6.4.3.6 Control de Calidad Detección Listeria monocytogenes. VIDAS - LMX bioMérieux.

6.4.3.7 Control de Calidad Detección Salmonella spp. VIDAS - SPT bioMérieux

7. CONCLUSIONES

8. BIBLIOGRAFIA

9. ANEXOS

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Activación de las cepas con fecha 13/03/2018 con su correspondiente caracterización macroscópica.

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Agar Sangre de Cordero al 5% de la casa comercial bioMérieux.

Imagen 2. Unidades KWIKSTIK Microbiologics.

Imagen 3. Unidades KWIKSTIK Microbiologics.

Imagen 4. Activación de la cepa de *E.coli* ATCC 25922 en agar sangre de cordero al 5%.

Imagen 5. Activación de la cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028 en agar sangre de cordero al 5%.

Imagen 6. Activación de la cepa *S. aureus* ATCC 2592 en agar sangre de cordero al 5%.

Imagen 7. Activación de la cepa *L. monocytogenes* ATCC 13932 en agar sangre de cordero al 5%.

Imagen 8. Activación de la cepa de *B. cereus* ATCC 14579 en agar sangre de cordero al 5%.

Imagen 9. Incubación de las cepas de referencia a 35°C +/- 2°C.

Imagen 10. Cepa de *E. coli* ATCC 25922 activa en Agar sangre de cordero al 5%.

Imagen 11. Macroscopía de *E. coli* ATCC 25922 en agar sangre de cordero al 5%.

Imagen 12. Cepa de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 en agar sangre de cordero al 5%.

Imagen 13. Macroscopía de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 en sangre de cordero al 5%.

Imagen 14. Cepa de *S. aureus* ATCC 25923 en agar sangre de cordero al 5%.

Imagen 15. Macroscopía de *S. aureus* ATCC 25923 en agar sangre de cordero al 5%.

Imagen 16. Beta-Hemolisis de *S. aureus* ATCC 25923 en agar sangre de conejo al 5%.

Imagen 17. Cepa de *L. monocytogenes* ATCC 13932 en agar sangre de cordero al 5%.

Imagen 18. Macroscopía de *L. monocytogenes* ATCC 13932 en agar sangre de cordero al 5%.

Imagen 19. Cepa de *Bacillus cereus* ATCC 14579 en agar sangre de cordero al 5%.

Imagen 20. Macroscopía de *B. cereus* ATCC 14579 en agar sangre de conejo al 5%.

Imagen 21. Beta-Hemolisis de *B. cereus* ATCC 14579 en agar sangre de conejo al 5%.

Imagen 22. Control de Calidad ReadyCult Coliforms 100.

Imagen 23. Control de Calidad ReadyCult Coliforms 100 posterior a incubación.

Imagen 24. Control de Calidad Petrifilm 3M *E. coli* coliforms.

Imagen 25. Control de Calidad Petrifilm 3M *E. coli* coliforms posterior a la incubación.

Imagen 26. *E. coli* ATCC 25922 dilución 10⁻⁶ en medio Petrifilm 3M *E. coli* Coliforms.

Imagen 27. Control de Calidad Petrifilm 3M Staph Express.

Imagen 28. Control de Calidad Petrifilm 3M Staph Express posterior a la incubación.

Imagen 29. *S. aureus* ATCC 25923 dilución 10^{-6} en medio Petrifilm 3M Staph Express.

Imagen 30. Control de Calidad Agar Bacara bioMérieux.

Imagen 31. Control de Calidad Agar Bacara bioMérieux.

Imagen 32. *B. cereus* ATCC 14579 dilución 10^{-6} en medio Agar BACARA.

Imagen 33. Control de Calidad Petrifilm 3M Aerobic Count Plate.

Imagen 34. *B. cereus* ATCC 14579 dilución 10^{-6} en medio Petrifilm 3M Aerobic Count Plate.

Imagen 35. Control de Calidad VIDAS – LMX bioMérieux.

Imagen 36. Control de Calidad VIDAS-LMX.

Imagen 37. Control de calidad VIDAS-LMX.

Imagen 38. Control de calidad VIDAS-LMX.

Imagen 39. Resultado Control de calidad VIDAS-LMX posterior a los 80 minutos de análisis.

Imagen 40. Control de Calidad VIDAS–SPT bioMérieux.

Imagen 41. Control de calidad VIDAS-SPT.

Imagen 42. Montaje al equipo VIDAS.

Imagen 43. Resultado Control de calidad VIDAS-STP.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Archivo Excel FORMATO PRUEBAS DE VIABILIDAD DEF.

ANEXO 2. Registro Controles Del Cepario 2018.

INTRODUCCIÓN

Al momento de establecer una colección de cultivos o un cepario es necesario que la preservación de los microorganismos sea exitosa. Para lograr este objetivo se debe tener conocimiento de técnicas modernas y actualizadas; a través de las cuales se genera un daño mínimo a las células, y es posible asegurar su viabilidad a través de largos periodos de tiempo en donde sus características axénicas, genotípicas y fenotípicas no se vean alteradas y/o afectadas (Safronova, 1996).

Las empresas encargadas de la producción y distribución de alimentos derivados cárnicos deben caracterizarse por elaborar productos de calidad e inocuos, ofreciendo al consumidor alimentos nutritivos y seguros para el consumo. A través de la práctica empresarial; específicamente en el laboratorio de microbiología se ponen en ejecución todos los conocimientos adquiridos a lo largo de la formación universitaria y al mismo tiempo entender, comprender y dominar los saberes, protocolos, metodologías y procedimientos aplicados que se realizan en un laboratorio de Microbiología en planta productora de alimentos. A través del laboratorio de microbiología y métodos de análisis es posible poseer una confiabilidad acerca de la calidad e inocuidad microbiológica, sobre los alimentos que se producen, y así mediante los métodos de análisis y bajo la NTC 1325, aplicados a productos terminados, materias primas cárnicas y no cárnicas, manipuladores, agua potable, ambientes y superficies indicadores, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y controles internos; se asegura la calidad y la inocuidad de los alimentos que se producen y comercializan.

Por esta razón y retomando la actividad del cepario en el laboratorio se plantea aplicar y estandarizar una técnica de conservación y mantenimiento de 5 cepas de referencia en presentación KwickStick; *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes (serotipo 4b)* ATCC 13932, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella entérica subsp. enterica serovariedad typhimurium* ATCC 14028 activadas en agar sangre de conejo al 5%; para ser empleadas en el control de calidad de los métodos de análisis en el laboratorio de microbiología de una empresa productora de alimentos derivados cárnicos y ser estandarizado a lo largo del tiempo promoviendo el aseguramiento de la calidad y el buen funcionamiento de la colección. Se aplica una técnica de mantenimiento a corto plazo denominada subcultivo seriado o transferencia periódica; conservando en refrigeración 2°C a 4°C bajo condiciones estériles. A partir de estas cepas de referencia en condiciones óptimas, se emplean para asegurar que los métodos de análisis microbiológico cumplan con los resultados esperados confiables, sin errores y no existan relaciones de información dudosa, dando al laboratorio mayor confiabilidad y credibilidad en los resultados que se reportan. Esta técnica de mantenimiento es más propensa a contaminaciones y variaciones en las características fenotípicas y genotípicas de los microorganismos en cuestión, por esta razón los procedimientos deben llevarse a

cabo con la mayor rigurosidad respecto a inocuidad, manipulación de los microorganismos y buenas prácticas de laboratorio, para así poder mantener las cepas con ausencia de contaminaciones y la menor variabilidad fenotípica y genotípica.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Aplicar una técnica de conservación y mantenimiento de 5 cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes (serotipo 4b)* ATCC 13932, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; para ser empleadas en el control de calidad de los métodos de análisis en el laboratorio de microbiología de una empresa productora de alimentos derivados cárnicos.

1.2 Objetivos Específicos

1. Mantener las cepas de referencia viables y en cultivos axénicos, con el propósito de ser empleadas en el control de calidad de los métodos de análisis del laboratorio.
2. Conservar las cepas de referencia del laboratorio de microbiología bajo condiciones de refrigeración con el fin de establecer su viabilidad a través del tiempo.
3. Sostener las cepas de referencia del laboratorio de microbiología sin cambios en sus características fenotípicas y metabólicamente activos para uso del laboratorio.

2. JUSTIFICACIÓN

El laboratorio de microbiología de una empresa productora de alimentos derivados cárnicos debe contar con un cepario, en donde se mantienen y conservan microorganismos de referencia, por medio de los cuales es posible la realización de un control de calidad de los métodos de análisis empleados. Los controles de calidad son trascendentales para mantener la trazabilidad y reproducibilidad de los métodos de análisis empleados en el laboratorio, otorgando la facultad de reportar resultados confiables y seguros. Así con el mantenimiento y conservación de las cepas a través del buen uso del cepario el laboratorio adquiere, también; mayor veracidad respecto a los resultados que allí reporta, en donde a nivel nacional sus resultados y datos serán confiables y ausentes de conclusiones erróneas, confusas o incorrectas.

Por estas razones se realiza el presente proyecto; y con el fin de reanudar las condiciones, operaciones y procedimientos óptimos para hacer correcto uso y manejo del cepario; cepas que son empleadas en la evaluación de la productividad y selectividad de los métodos de análisis microbiológico empleados en el laboratorio.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 Marco Legal

El sector cárnico colombiano, el funcionamiento del laboratorio de microbiología de una empresa productora de alimentos derivados cárnicos y el funcionamiento de su cepario; actualmente, se dirige y conduce bajo una serie de normativas o legislación conformadas por leyes, resoluciones, decretos, normas técnicas colombianas, ICONTEC y normas ISO, cuyo propósito es reglamentar todos los aspectos y parámetros relacionados con el desarrollo de la industria cárnica, el manejo del cepario, los sistemas de gestión de calidad ensayo y calibración de los laboratorios, parámetros, condiciones y características de los alimentos derivados cárnicos. Las cuales son las siguientes:

*Ley 9 de 1979. Por la cual se dictan Medidas Sanitarias.

*Decreto 2278 de 1982. Por la cual se reglamenta parcialmente el título V de la Ley 09 de 1979 en cuanto al sacrificio de animales de abasto público o para consumo humano y el procesamiento, transporte y comercialización de su carne.

*Decreto 2162 de 1983. Por el cual se reglamenta parcialmente el título V de la Ley 09 de 1979 en cuanto a producción, procesamiento, transporte y expendio de los productos cárnicos procesados.

*Decreto 2131 de 1997. Por el cual se dictan disposiciones sobre productos cárnicos procesados.

*Ley 914 de 2004. Por la cual se crea el sistema Nacional de Identificación e Información de Ganado Bovino.

*Decreto 1500 de 2007 y el Decreto 2270 de 2012 (que lo modifica). A través de los cuales se determina el reglamento técnico en el país y se crea el Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control a lo largo de la cadena cárnica (bovinos y bufalinos, porcinos, zocrías, ovinos y caprinos).

*Norma Técnica Colombia NTC (ICONTEC) 1325 de 2008: la cual establece los requisitos que deben cumplir los productos cárnicos procesados no enlatados.

*Resolución 2905 de 2007. Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios y de inocuidad de la carne y productos cárnicos comestibles de la especie bovina y bufalina destinados para el consumo humano y las disposiciones para su beneficio, desposte, almacenamiento, comercialización, expendio, transporte, importación o exportación.

*Resolución 3659 de 2008. Por la cual se establecen los criterios del Plan de Racionalización de Plantas de Beneficio Animal.

*La norma ISO 9001:2008 que “promueve la adopción de un enfoque basado en procesos cuando se desarrolla, implementa y mejora la eficacia de un sistema de gestión de la calidad, para aumentar la satisfacción del cliente mediante el cumplimiento de sus requisitos”.

*La norma ISO 11133:2014: Señala las directrices que debe poseer la Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua. Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo.

*Resolución 1619 del 15 de mayo de 2015, del Ministerio de Salud y Protección Social: Por la cual se establece el sistema de gestión de la red nacional de laboratorios en los ejes estratégicos de vigilancia en salud pública y gestión de calidad, que deben tener en cuenta para su funcionamiento los integrantes de dicha red.

*Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025 de 2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración: A partir de esta norma internacional se establecen los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos, y/o calibraciones, incluido el muestreo. Cubre los ensayos y las calibraciones que se realizan utilizando métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos desarrollados por el propio laboratorio.

3.2 Marco Teórico

▪ **Antecedentes**

A través de la microbiología es posible el estudio de todas las formas de vida microscópica que hacen parte y se relacionan directa y funcionalmente con la naturaleza, el suelo, el aire, el agua, los seres humanos, los animales, las plantas y los alimentos. La microbiología como ciencia posee dos enfoques principales siendo la comprensión de los procesos vitales básicos y la aplicación de ese conocimiento para beneficio de la humanidad. Los microorganismos siendo las formas más pequeñas de vida, en conjunto componen la mayor parte de la biomasa sobre el planeta, además de realizar procesos químicos necesarios para

otros organismos y para nosotros como el oxígeno que respiramos, producto de la actividad microbiana (Madigan et al., 2009).

Diversos métodos se han desarrollado a lo largo del tiempo para lograr la conservación de los microorganismos por medio de la reducción de su metabolismo. Estas técnicas de preservación de microorganismos son muy importantes debido a su empleo en campos de investigación o ciencias clínicas aplicados a la microbiología o biotecnología. Estos microorganismos son empleados en muchos campos de la industria como lo son en: alimentos, agricultura, farmacéutica y salud, energía y biorremediación, estas industrias necesitan de la autenticidad y viabilidad de las cepas; y del mantenimiento de los rasgos genotípicos y fenotípicos de los microorganismos. Las cepas serán útiles para las aplicaciones industriales mientras permanezcan viables y mantengan sus funciones celulares posterior al proceso de mantenimiento y conservación. Algunos de los agentes crioprotectores empleados para la preservación bacteriana son el glutamato, leche desnatada, glicerol, glucosa, sacarosa, DMSO, entre muchos otros y su aplicación se realizará dependiendo de la naturaleza del microorganismos y método de conservación seleccionado. Estos agentes son sustancias que controlan eficientemente la velocidad de congelación de las células y adicionalmente son permeables a la membrana celular, razón por la cual su efecto protector se incrementa (Krumnow et al., 2009).

▪ **Historia e Importancia de las colecciones de cultivos**

Las colecciones de microorganismos se desarrollaron a finales del siglo XIX, con el objetivo de figurar como repositorios de los recursos biológicos para impulsar el desarrollo de las ciencias y la investigación (Gutiérrez et al., 2015). Con el establecimiento del método para generar cultivos puros y la investigación científica, esta necesitó del uso de cepas axénicas, y por ende la necesidad de mantener los microorganismos se volvió fundamental (Hunter et al., 1996).

Las técnicas o métodos de mantenimiento y conservación de microorganismos han sido de gran interés científico desde la década de 1930, aun así estos métodos se originaron hace cientos de años por ancestros primitivos e indígenas sin saber de ellos. Estos métodos han sido empleados por ejemplo para la elaboración de cerveza a partir de porciones del “brebaje”, siendo este empleado como una especie de “semilla” para la próxima elaboración y producción de cerveza (Hunter et al., 1996).

A través del tiempo, específicamente durante las dos últimas décadas, ha sido de gran importancia poder garantizar una preservación óptima de los microorganismos con intereses industriales, en alimentos funcionales, farmacéuticos, así como en la generación de biocombustibles y metabolitos de uso general. Esta conservación debe ser a largo plazo con el fin de asegurar un alto grado de estabilidad celular durante todo el proceso de conservación. Al mismo

tiempo se trabaja en la generación de nuevas técnicas o modificación de parámetros los cuales pretenden mejorar o magnificar la estabilidad y funcionalidad de los microorganismos sometidos a conservación. Para la microbiología industrial es de vital importancia elegir un método el cual brinde resultados completos y eficientes, garantizando la propagación de las células para la producción de metabolitos donde sus rendimientos y productividades sean óptimos y de alta calidad. A través de la innovación y mejoras de las técnicas es posible disminuir la inestabilidad celular durante el proceso y evaluar los factores con mayor incidencia sobre la viabilidad y capacidad de producción metabólica de las células (Alonso, 2016).

Los primeros cultivos de microorganismos consistieron en caldos nutritivos y extracto de malta, para bacterias y hongos, respectivamente. A través del empleo de gelatina y el agar fue posible mantener estos medios de cultivo en estado sólido, siendo incubados a temperatura ambiente del laboratorio; su mantenimiento y conservación se realizó mediante transferencias o subcultivos sucesivos a intervalos de tiempo apropiados. El desarrollo de este método y la frecuencia de los subcultivos trajeron consigo una variabilidad en las actividades fisiológicas consignadas inicialmente y detrimento en el crecimiento celular. Se encontró que una solución a este inconveniente potencial era minimizar el crecimiento microbiano y suprimir las actividades metabólicas por medio del uso de temperaturas bajas (refrigeración, congelación y ultra congelación) (Hunter et al., 1996).

Unas de las primeras técnicas de almacenamiento a largo plazo en donde se emplearon varias especies de levaduras, siendo suspendidas en solución estéril de sacarosa al 10%, realizada por Will en el año 1970, las células se mantuvieron viables hasta por 8 años; algunos inconvenientes que se presentaron fueron la reducción significativa de sus actividades fisiológicas y la ausente recuperación de las levaduras después de la inoculación repetida en cultivos nuevos y frescos. A partir de estos inconvenientes se recomendó que la levadura debería ser suspendida en solución de sacarosa al 10% y muy importante almacenarle en un lugar fresco y oscuro (Hunter et al., 1996).

Los primeros microorganismos almacenados bajo liofilización fueron *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* en el año de 1911 por el científico Hammer. En el año 1883 Morton y Pulski recomendaron el método desarrollado por Lumiere y Cherrotier en donde los últimos autores conservaron a *Gonococcus* spp. en un medio con suero y parafina líquida superpuesta; este método comenzó a utilizarse para variedad de microorganismos debido a su simplicidad, ausencia de equipos especializados y su aplicabilidad a los cultivos para ser conservados durante largos periodos de tiempo (Hunter et al., 1996).

Los microorganismos cumplen papeles fundamentales y esenciales en gran parte de los procesos que se presentan en los ecosistemas del planeta tierra; estos son

procesos biogeoquímicos o ciclos de materiales, depuración de contaminantes, tratamientos biológicos de aguas residuales o la misma producción de oxígeno, estos seres microscópicos se consideran el pilar de la biotecnología moderna, en donde estos conocimientos pueden ser aplicados a la producción de bioenergía y metabolitos como bioplaguicidas, biofertilizantes, entre otros bioproductos que mejoran la calidad de vida del ecosistema y la salud humana. La conservación de los microorganismos solo se hace útil o adecuada cuando las técnicas elegidas no alteran o afectan la morfología, fisiología, pureza y genética de las células; es crucial conservar cuidadosamente los microorganismos para ser empleados en un futuro en la investigación, la enseñanza o aplicaciones industriales (Prakash et al., 2012).

La primera colección de bacterias y hongos se estableció a finales del siglo XIX. Para el año de 1880; el profesor Frantisek Král fundó la primera colección de bacterias y hongos del mundo en Praga, esta consistió en una colección privada en donde se encontraban cepas como *Mycobacterium tuberculosis* y *Agrobacterium tumefaciens*, esta colección caducó en 1911. A partir de este punto colecciones privadas fueron establecidas en países como Inglaterra, Holanda, Alemania, Japón y Estados Unidos. Esta colección ha sido gradualmente reemplazada por la colección de cultivos pública. En el año de 1906 se publicó el primer catálogo de cepas recolectadas, siendo uno de los objetivos principales de una colección microbiana (Hunter et al., 1996).

Tras la organización de la sociedad bacteriológica americana en el año 1911, plantearon una colección bacteriana para uso público; la cual finalmente se estableció en el museo de historia nacional de la ciudad de Nueva York. A partir de esta organización y en el año 1995 se fundó la Colección de Cultivos Americana (ATCC, siglas en inglés), siendo actualmente una de las colecciones más grande y completa del mundo (Hunter et al., 1996).

Para el año de 1944 y a petición del consejo de ministros, Takeda Chemical Industries, Ltd. fundó el instituto de fermentación aérea para la recolección, almacenamiento y distribución de microorganismos útiles para la investigación y producción de combustibles aeronáuticos, así como drogas y alimentos. Los microorganismos pertenecientes a este instituto japonés previamente fueron almacenados en institutos de investigación, universidades y empresas privadas. Posteriormente fue nombrado después de la segunda guerra mundial como el Instituto para la fermentación Osaka (IFO) y actualmente es la mayor colección de cultivos en Japón (Hunter et al., 1996).

Los esfuerzos de las investigaciones encaminadas a comprender la mutagénesis durante el almacenamiento y las investigaciones acerca de la producción de antibióticos se inició a finales de la década de 1940, dando motivos para lograr cambios graduales en las técnicas de conservación. El principal interés estuvo enfocado en la "estabilidad del producto"; se ejecutaron diversas investigaciones

sobre técnicas y métodos de preservación y almacenamiento. En algunos de los resultados se publicaron procedimientos en donde se emplea la liofilización y parafina líquida considerada eficaz y usada en combinación con el almacenamiento a bajas temperaturas. También se inició con técnicas en el que los microorganismos se adsorben en el suelo o la arena, así como el almacenamiento a temperaturas de congelación y ultra-congelación, nitrógeno líquido en donde la viabilidad de las células se registró en un rango supervivencia de 10 a 20 años (Hunter et al., 1996).

- **Colecciones de cultivo**

Actualmente se estima que la gran variedad de progenie bacteriana es inexplorada y se conoce muy poco sobre ella; con ello la capacidad y comportamiento metabólico. A partir de esta afirmación y sobre el estudio de estos linajes desconocidos es probable que posean y muestren nuevas rutas biosintéticas o características bioquímicas aprovechables, los microorganismos ofrecen potencialmente nuevas e innovadoras soluciones para la biotecnología, la agricultura y la salud pública (Overmann et al., 2017). La creación de colecciones de cultivos, y el desarrollo de técnicas de preservación, ha ido incrementando en los últimos años, esto debido a los avances y necesidades en las áreas de investigación biológica, con énfasis en biotecnología, alimentos, medicina, agroindustria, entre otros. La validación y control de calidad de los resultados obtenidos entre los diferentes grupos de investigación y laboratorios se ha logrado, gracias a la disponibilidad de cultivos puros a partir de las colecciones, lo cual establece un punto común entre los diferentes grupos (Hunter et al., 1996).

Las colecciones de cultivos son un conjunto de elementos disponibles de gran valor; debido a que provee de forma inmediata y permanente las cepas necesarias para diferentes tareas del laboratorio como identificación taxonómica, estudios de epidemiología, controles de calidad, enseñanza e investigación, microbiología alimentaria, médica; entre otros. La elección del método de conservación debe ser muy acertada considerando el número de microorganismos, su naturaleza, el propósito, el tiempo deseado de conservación y la disponibilidad de materiales y equipos (López et al., 1999).

Encontramos a la Federación Internacional de Colecciones de Cultivos (World Federation for Culture Collection - WFCC) consiste en un conjunto de Comités, Comisiones y Federaciones (COMCOF) de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología (Internacional Union of Microbiological Societies - IUMS) y un miembro científico de la Unión Internacional de Ciencias Biológicas (Internacional Union Biological Sciences IUBS). El propósito principal de la WFCC se basa en promover y desarrollar colecciones de cultivos de microorganismos y líneas celulares. También fundamentalmente provee asistir y asesorar a nuevas colecciones en el establecimiento de las mismas y da continuidad y apoyo a colecciones existentes. Las organizaciones que hacen parte de la WFCC

conforman “una única red global para la preservación ex situ de la diversidad microbiana que sostiene la vida en la tierra”, a partir del año 2010, Año Internacional de la Biodiversidad (WFCC, 2010).

La WFCC emite en el año 1980 la primera edición de los “lineamientos o Pautas para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos”, en donde por primera vez se dio un apoyo oficial a las colecciones de cultivos de microorganismos de muchos países, e instituciones individuales que realizaban por primera vez el establecimiento de su colección microbiana. A través de estos documentos y posteriores que siguen siendo actualizados; en donde el objeto de estos lineamientos consiste en asistir a colecciones de microorganismos que ofrecen servicios fuera de su propia institución, sin embargo muchos de los lineamientos se adaptan más fácilmente a la aplicación en colecciones internas o de investigación (WFCC, 2010).

▪ **Propósito de la colección**

La colección de material biológico depende del interés por el cual, esta va a ser utilizada, por lo tanto las colecciones deben ser creadas con base en la selección ordenada de criterios reconocidos o de importancia científica. Es importante que toda colección establezca un sistema de registro de datos, con relación a la historia, información de la fuente de aislamiento, publicaciones, condiciones de almacenamiento y manipulación (Stevenson et al., 1992). Hablando directamente desde una empresa productora de alimentos establecer y hacer uso correcto del cepario permite realizar diagnósticos y/o análisis microbiológicos pertinentes a través del control de calidad de los métodos de análisis rutinario (Lopardo et al., 2012).

▪ **Métodos de Conservación**

Todo laboratorio de microbiología de una empresa productora de alimentos debe contar con su colección de cepas microbianas; es decir un cepario.

Para elegir el método de conservación más adecuado es preciso considerar cuatro aspectos esenciales: 1. la pureza del cultivo, 2. mantener el 70% de las células viables y metabólicamente activas, 3. sostener la estabilidad fenotípica y genotípica al final de la conservación de las cepas y por último los costos y recursos necesarios para desarrollar el proceso de conservación. Encontramos múltiples métodos de conservación, algunos de ellos son: transferencia periódica, congelación convencional o en nitrógeno líquido, liofilización y desecación en sílica gel, arcilla o arena estéril; estos métodos se clasifican según el tiempo de conservación; a corto, mediano y largo plazo, respectivamente (Ortiz et al., 2016).

Los métodos de conservación y en general pueden clasificarse según el tiempo en que permanecen viables las células en conservación, estos son métodos a largo,

mediado y corto plazo (Weng et al., 2005). Existen diversos métodos por los cuales se logra exitosamente la preservación de los microorganismos. Técnicas a corto plazo como: subcultivo seriado, utilizando placas de agar sólido, algunas ocasiones recubierto de aceite mineral estéril y otras veces en cultivos inclinados. El gel de Sílice es uno de los soportes empleados con mayor frecuencia para los métodos de mediano plazo (Prakash et al., 2012). Las técnicas para conservar a largo plazo son el secado y la criopreservación; aun así el uso de estas dos técnicas genera efectos nocivos hacia la viabilidad, estabilidad y funcionalidad de las células microbianas, esta desventaja se puede eliminar evaluando y estableciendo un procedimiento estratégico dinámico entre la estabilización y el daño celular. La liofilización es la técnica por elección para el almacenamiento a largo plazo, sin embargo la técnica de secado por pulverización se elige como la mejor opción para la deshidratación microbiana porque posee una alta flexibilidad de procesamiento y su costo es rentable en un entorno industrial (Alonso, 2016).

Métodos a corto plazo: La transferencia periódica es una técnica a través de la cual se permite la supervivencia de cultivos a cortos periodos de tiempo (1 a 3 meses). Consiste en transferir el cultivo a medios frescos a una frecuencia determinada de tiempo; proporcionando las condiciones óptimas de crecimiento (Weng et al., 2005). La realización de subcultivos o repiques es una operación de transferencia imperativa, puesto que al mantenerse las células activas en medios de cultivo, la acumulación de compuestos tóxicos producto del metabolismo microbiano da origen al envejecimiento y muerte celular. A su vez, al realizar cada transferencia se incrementa la probabilidad de mutaciones, lo que ocasiona cambios fenotípicos y genéticos, la pérdida de la pureza de los cultivos debido al manejo sostenido (Gutierrez et al., 2015).

No obstante de los inconvenientes del método, aún sigue siendo empleado en todos los laboratorios y durante mucho tiempo, a causa de ser un método básico y simple de desarrollar. Infortunadamente, el daño a los cultivos relacionado con los cambios en sus características genotípicas y fenotípicas no es posible de evitar. Los cambios ocurridos en ocasiones pueden dar lugar a observar cultivos totalmente diferentes en sus características comparado con su cultivo madre; a su vez no se considera un método eficiente para el almacenamiento cuando se trabaja con un gran número de cultivos fúngicos. Por otra parte la técnica es aplicada universalmente y actualmente es empleada en la mayoría de colecciones de cultivos de bajo presupuesto o como un segundo método de mantenimiento. En muchos artículos, la técnica del subcultivo es comparada con otros métodos de mantenimiento y/o conservación (Homolka, 2014).

Métodos a mediano plazo y largo plazo: Dentro de este grupo de clasificación encontramos técnicas a través de las cuales es posible mantener la viabilidad de las células bajo periodos de 2 a 5 años. Sobresalen técnicas como la desecación en soporte de sílice gel, arena, perlas de vidrio; entre otros. La técnica se fundamenta en detener el crecimiento por medio de la eliminación del agua celular

disponible. Otras técnicas de almacenamiento emplean como soporte arena estéril, parafina líquida o suspensiones en agua destilada o agua de mar estéril, estos últimos métodos se han documentado con mayor especificidad para la preservación de hongos. Los Métodos a largo plazo encontramos la congelación que se realiza a temperaturas desde los -70°C hasta los -196°C y la liofilización. Estas técnicas se caracterizan porque disminuyen al máximo los riesgos de cambios y variabilidades genéticas de las células, además que pueden permanecer viables por 10 años o más. Estos métodos de elección proveen algunas ventajas al poder conservar variedad de células; como pueden ser hongos, bacterias o levaduras; algas, suero, células sanguíneas, entre otros. Las desventajas de estos métodos radican en el elevado costo de los equipos que se usan lo que hace difícil poner en funcionamiento en variedad de instituciones (Weng et al., 2005).

Técnica de Secado

Unas de las técnicas de gran uso para preservar microorganismos durante décadas consiste en la liofilización, tal es su importancia que es el método de elección de las colecciones de cultivos en todo el mundo, por mencionar algunas la Colección Nacional de Cultivos (NCTC) y la Colección Americana de Cultivos (ATCC). Las características del material liofilizado facilitan un transporte, envío, manejo fácil y económico (Morgan et al., 2006). A través de la liofilización siendo un proceso de secado; se elimina el agua de células congeladas al vacío, se cataloga actualmente como un procedimiento universal y confiable en la preservación de microorganismos. Este método comprende algunas etapas en la que la viabilidad se ve afectada significativamente con una pérdida alta de células. Por esta razón se emplean agentes o medios crioprotectores los cuales pueden ser carbohidratos o compuestos proteicos, su función consiste en prevenir la muerte de las células bacterianas durante la congelación. Al penetrar las células, por ejemplo, los azúcares generan una presión osmótica alta, lo cual impide la formación de cristales de hielo que destruyen las células durante el proceso de congelación (Kharchenko et al., 2017).

Crio Preservación

Este método emplea temperaturas criogénicas para la conservación de materiales biológicos; temperaturas, generalmente de -80°C (hielo seco) o -196°C (Nitrógeno líquido). El uso de temperaturas de ultra congelación permite la protección a la desnaturalización de las proteínas y el DNA, a su vez que disminuye el movimiento de agua celular. Las temperaturas de -20°C no son recomendadas para la preservación por periodos largos, se emplean las temperaturas de -80°C adecuadas, y -196°C temperatura ideal debido a que la posibilidad de que ocurra mutación a esta temperatura es mínima y se logra la máxima reducción de las actividades bioquímicas y fisiológicas de las células (Prakash et al., 2012).

Los crioviales se almacenan en nitrógeno líquido a -196°C o en fase de vapor a -135°C a -150°C , se prefiere la fase de vapor porque se evita o previene la entrada de nitrógeno en fase líquido dentro del criovial, esto ofrece protección contra contaminación viral y/o estallidos. En la preservación bajo temperaturas criogénicas por lo general se trabaja con glicerol al 10% a 15% o DMSO al 5% a 10%. Dos factores importantes son: la tasa de enfriamiento y la descongelación, estos parámetros son cruciales para la conservación y reactivación de las células. Se establece que una velocidad de enfriamiento controlada de 1°C a 5°C por minuto y para la descongelación debe ser rápida en baño María a 37°C son condiciones óptimas para mantener la viabilidad celular. Los efectos del uso de temperaturas bajas y ultra bajas difieren en la supervivencia de los tipos de células (bacterias, Archeas, levaduras, mohos o células eucariotas), así como también interfiere el tamaño de la célula, su permeabilidad al agua o la presencia de pared celular (Prakash et al., 2012). El uso de la crioconservación a empleando bajas temperaturas posee un fuerte enfoque para una preservación eficiente de la funcionalidad celular (crecimiento, morfología, producción de metabolitos) en basidiomicetos (Alonso, 2016).

Resumiendo, las técnicas de preservación pueden resultar más, o menos efectivas dependiendo del grupo microbiano que se requiere preservar. Esto quiere decir que para la elección y consideración de la aplicación de una técnica de conservación debemos tener presente los aspectos mencionados anteriormente, la literatura disponible acerca de este tema y los microorganismos en estudio, las alternativas que se pueden emplear en el mantenimiento, relacionando todos estos factores a las condiciones reales del laboratorio y la colección. Concluyendo, no existe una técnica establecida, estándar o específica para conservar apropiadamente todos los grupos microbianos existentes, cada grupo microbiano posee características únicas a considerar; que nos llevan a la mejor elección del método de conservación (Weng et al., 2005).

➤ ***Escherichia coli***

Escherichia coli es una bacteria común que se encuentra en los intestinos de animales y personas. Se trata de bacilos Gram negativos anaerobios facultativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, motil por flagelos peritricos con dimensiones de 0.5×1.9 a 3.0 micras, no esporulada. Su bioquímica típica consiste en la fermentación de la glucosa y la lactosa, así como, positiva al indol, descarboxilación de lisina, fermenta el manitol produciendo gas a partir de la glucosa, y es citrato negativa. Este bacilo cumple un papel muy importante en el correcto funcionamiento del proceso digestivo y está relacionado con la producción de vitaminas B y K. En la mayoría de los casos *E. coli* se encuentra en los intestinos humanos sanos; sin embargo, algunos serotipos pueden causar diarrea y otras enfermedades sistémicas (Puentes et al., 2018).

La clasificación los grupos de *Escherichia coli* causantes de diarrea se basa en las diferencias antigénicas y el mecanismo de patogenicidad, dividiéndose en 6 grupos: *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), y *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC). El serotipo con mayor prevalencia relacionado con alteraciones intestinales es la ETEC estos casos ocurren particularmente en sectores desprotegidos, y las personas que viajan a esas áreas, por esta razón también es llamada la diarrea del viajero (Mirhoseinia et al., 2018).

Según datos del CDC se estima que cada año se producen 265,000 infecciones de STEC en los Estados Unidos. STEC O157:H7 causa alrededor del 36% de ellos. Los CDC estiman que STEC causa 3,600 hospitalizaciones en EE. UU. Y 30 muertes cada año (CDC, 2016).

Entre los meses de Junio a Septiembre de 2016 se reportó un brote donde once personas presentaron una infección por la cepa STEC O157:H7 informándose en cinco estados de Estados Unidos. No hubo muertos y se hospitalizaron 5 personas. La evidencia epidemiológica, de rastreo y de laboratorio indicó que los productos de carne de res producidos por Adams Farm Slaughterhouse en Athol, Massachusetts, fueron la fuente probable de este brote (CDC, 2016).

En Colombia la enfermedad diarreica aguda (EDA) es considerada la segunda causa más común de morbilidad en Colombia, presenta una incidencia de 110 casos por cada 100.000 habitantes. Se estima que las EDA pueden estar asociadas en un 50% a agentes virales, un 20 a 30% a agentes bacterianos y un 20 a 30% a otras causas. Reportes actualizados en la región del Caribe Colombiano indican que la frecuencia es del 7.5% del total de diarreas a causa de *E. coli*. Aunque la diarrea por *E. coli* es mucho más frecuente en países de bajos ingresos donde puede ser de hasta el 50% del total de casos, la frecuencia de infección debido a este agente en otros países de Latino América como Argentina, México y Brasil variando entre el 6 y el 28% (Gómez, 2014).

El 13 de junio de 2011, el Ministerio de la Protección Social informó, que el brote presentado de *E. coli* en la ciudad de Montería, Córdoba, en el cual se vio involucrado un masculino colombiano, no fue compatible con los casos que se presentan en Europa a raíz del brote ocasionado por *E. coli* O104:H4 (MINSALUD, 2011).

En Colombia y a través de las plataformas del INS y el Sivigila, se encuentran registrados los boletines epidemiológicos semanales de cada año, en donde se puede ubicar información con referente a brotes por ETA's. Aun así la información que se encuentra se ve limitada en cuanto a que en la mayoría de boletines no se establece el agente etiológico del brote sino que se clasifica como brote por ETA o

Enfermedad diarreica aguda (EDA) sin concluir sobre los resultados del agente causal obtenidos a través del diagnóstico microbiológico en laboratorio. En la semana 37 del año 2017, siendo 19 de septiembre de 2017 se recibió información sobre un brote de ETA de agente causal identificado, que afectó a la comunidad de Cartago, Valle del Cauca; 5 personas se vieron afectadas con una tasa de ataque del 100%. La presencia de síntomas posterior al consumo de alimento el 13 de septiembre a las 10 y 12 horas, en donde todos los pacientes fueron hospitalizados, entre ellos cuatro requirió UCI y uno en hospitalización general por deshidratación. Los pacientes evolucionaron adecuadamente al tratamiento clínico. Los resultados de laboratorio preliminares de Hemocultivos y Coprocultivos fueron negativos a las 24, 48, y 72 Horas de Incubación. En un paciente se identificó un resultado Positivo para *E. coli* en un coprocultivo. Se encuentran pendientes los resultados de laboratorio y de muestras de alimentos obtenidas (INS, 2017).

➤ ***Salmonella* spp.**

El género *Salmonella* spp. pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, generalmente móviles por flagelos peritricos a excepción de *S. gallinarum*, son anaerobios facultativos no capsulados ni esporulados. Generalmente encontramos a *Salmonella* en el ganado y es excretada en las heces. También es una fuente importante de contaminación durante las prácticas de ordeño y procesamiento de leche. Los serotipos más comunes relacionados con enfermedades en humanos son *S. enteritidis* y *S. typhimurium*. *Salmonella* se considera un patógeno transcendental en la salud pública, siendo un riesgo para la salud de todo el mundo; a su vez su presencia se considera como la causa más común de enfermedades asociadas con el consumo de productos lácteos y cárnicos (Savran et al., 2017). Las manifestaciones clínicas básicamente se presentan bajo dos clases: afecciones gastrointestinales y la forma septicémica (Gallego, 2014).

Dentro del grupo de las *Salmonella* no tifoidea (NT), encontramos a *S. entérica serovariedad typhimurium* (STM), caracterizándose por ser un patógeno importante transmitido por alimentos contaminados en todo el mundo. Su impacto en la salud humana es alto y en comparación a otros patógenos se presenta con mayor frecuencia atacando grupos vulnerables o inmunosuprimidos (Herrero et al., 2018).

Según datos del CDC, se estima que la salmonelosis es la causante de más de 1.2 millones de enfermedades cada año en los Estados Unidos, con más de 23,000 hospitalizaciones y 450 muertes. Las infecciones por *Salmonella* a menudo causan gastroenteritis, que pueden variar de leve a grave. Sin embargo, las infecciones invasivas también pueden ocurrir y puede ser severas poniendo en peligro la vida del ser humano (CDC, 2013).

Entre el 17 de Marzo de 2017 y el 22 de Junio de 2017, en Estados Unidos 16 estados identificaron brotes de infecciones de 24 personas por *Salmonella typhimurium* vinculadas a varios laboratorios clínicos de microbiología, comerciales y universitarios. Se demostró que la cepa de *Salmonella typhimurium* que causó enfermedad en este brote está estrechamente relacionada genéticamente con una cepa de un brote en 2014 y un brote en 2011, ambos vinculados a laboratorios de microbiología. No hubo muertes y ocurrieron 6 hospitalizaciones. Este brote rescata el riesgo potencial de una infección por *Salmonella* asociada con el trabajo en laboratorios de microbiología (CDC, 2017).

Otra caso se reportó en Estados Unidos, desde el 8 de enero de 2018 hasta el 20 de marzo de 2018; donde un total de 265 personas fueron infectadas con las cepa *Salmonella typhimurium* reportándose en 8 estados. La evidencia epidemiológica, de laboratorio y rastreo indicó que la ensalada de pollo producida por la empresa Triple T Specialty Meats, Inc. y vendida en las tiendas Fareway era la fuente probable de este brote en varios estados, no hubo muertes. A partir del 6 de abril el brote parece haber terminado (CDC, 2018)

La vigilancia de *Salmonella* spp. en Colombia se decretó a partir de 1997, consiste en una red de información en donde se envían aislamientos de los hospitales del país a 32 departamentos de salud pública (PHL) y a Bogotá. Una de estas organizaciones es el grupo de microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS) en donde se realiza una caracterización fenotípica a través de un serotipado y perfil de sensibilidad antimicrobiana y genotípica, determinada por la técnica de Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) (Rodríguez et al., 2017).

En la semana 52 del 2017 se presentó un brote por ETA con agente causal definido siendo *Salmonella* spp. el patógeno causante del brote. Este se dio en una institución educativa de Leticia, Amazonas, el día 14 de Diciembre por el consumo de un arroz Choufa (combinación de verduras y carnes). En la madrugada del 15 de diciembre en el Hospital San Rafael de Leticia informa el incremento de consultas por cuadro clínico gastrointestinal. Las muestras biológicas recolectadas arrojaron resultados positivos para *Salmonella* spp (INS, 2017).

➤ ***Staphylococcus aureus***

La familia *Staphylococcaceae* comprende cuatro géneros, de ellos el más importante clínicamente es el género *Staphylococcus*. Los miembros de este género son Gram positivos, anaerobios facultativos, inmóviles, que habitualmente forman agrupaciones de forma irregulares o racimos de uva, su bioquímica consiste en catalasa positivos, oxidasa negativos, fermentan la glucosa y poseen ácido teicóico en sus paredes celulares. *Staphylococcus aureus* es un patógeno facultativo que se encuentra colonizando las áreas nasofaríngeas, piel y

membranas mucosas de personas sanas portadoras que varía en 20% a 30%, a su vez causa infecciones invasivas graves. *S. aureus* puede causar infecciones endógenas, entre estas enfermedades invasivas agudas, como infecciones de la piel, tejidos blandos, endocarditis, sepsis, entre otros. Se conoce una actual diseminación de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), estas infecciones pueden tener posibilidades de tratamiento limitadas. No obstante, las cepas de *S. aureus* susceptibles a meticilina (MSSA) no deben subestimarse como patógenos inofensivos, estas pueden causar infecciones piógenas de igual severidad (Deinhardt et al., 2018).

En Estados Unidos y países industrializados *S. aureus* se considera una de las causas más destacadas generando infecciones bacterianas. Entre los años 1998 a 2005 *S. aureus* fue la bacteria con mayor frecuencia recuperada a partir de pacientes hospitalizados entre 300 laboratorios clínicos de Estados Unidos. También fue el segundo de los aislamientos con mayor recuperación después de *E. coli* generando bacteriemias en Europa hacia el año 2008. Fuentes recientes informan que *S. aureus* es el segundo patógeno asociado a infecciones en los Estados Unidos después de *Clostridium difficile* (Kobayashi et al., 2015). *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico de una amplia gama de infecciones, intoxicaciones alimentarias y síndrome de shock tóxico. Esta variedad de enfermedades está estrechamente ligada con los factores de virulencia, entre los que resaltan antígenos patógenos presentes en las células bacterianas, enzimas y toxinas, tales como enterotoxinas estafilocócicas (EE y SE) siendo importantes en los brotes por intoxicaciones (Hu et al., 2018).

En el año 2006 fue publicado el primer reporte de *S. aureus* como causa de infección de piel y tejidos blandos en Colombia, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina asociado a la comunidad (CA-MRSA) aumentó en un 4,4% entre 2001 (1%) y 2006 (5.4%). Aunque la vía de transmisión de MRSA a través de los alimentos no se ha investigado bien; no se conoce su predominio y el riesgo de exposición de los consumidores. Se hace vital determinar la relación de los alimentos en la transmisión de bacterias resistentes a los antibióticos, teniendo en cuenta que la prevalencia de SARM varía según la ubicación geográfica (Vanegas et al., 2012).

En la semana 10 del 2017 se presentó un brote con agente etiológico definido, siendo *E. coli* y *Staphylococcus* spp. presentes en las muestras de alimentos recolectadas. El brote se presentó el 8 de Marzo de 2017 en el municipio de San Carlos de Guaroa, Meta, la afectación se dio en 16 personas de 53 expuestas. Los posibles alimentos involucrados fueron pollo, espaguetis con pollo y crema de leche, consumidos dentro de la celebración del día de la mujer. Los síntomas fueron cefalea, náuseas, vómito y dolor abdominal, no hubo muertos (INS, 2017).

➤ *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes pertenece a la familia *Listeriaceae*. Se trata de un bacilo Gram positivo, patógeno intracelular facultativo del sistema retículo endotelial y móvil a temperaturas entre 20°C y 25°C, no presenta formas de resistencia. En relación con su metabolismo, es anaerobio facultativo, catalasa positiva y oxidasa negativo. Se distinguen 13 serotipos, siendo el 1/2a, el 1/2b y el 4b los principales causantes de enfermedades en humanos y animales. *L. monocytogenes* se encuentra en una variedad de matrices de alimentos incluidos productos cárnicos, mariscos, lácteos no pasteurizados, verduras así como en los entornos de la industria alimentaria; en la mayoría de los casos *L. monocytogenes* llega a los alimentos durante la producción, envasado, transporte y almacenamiento del producto (Amajoud et al., 2018).

La listeriosis causada por *Listeria monocytogenes* se transmite por los alimentos siendo las personas de avanzada edad y personas inmunodeprimidas las más susceptibles a contagiarse. La enfermedad presenta una tasa de mortalidad del 20% a 30%, esta bacteria es considerada una amenaza para la cadena alimentaria debido a la ausencia de un tratamiento u otro procedimiento antimicrobiano en la producción y el consumo (Jordan et al., 2018).

En la unión Europea en el año 2015, se notificaron y confirmaron 2206 casos (0,46 casos por cada 100,000 habitantes), cifras similares a 2014. En 2015, diecinueve estados miembros reportaron 270 muertes por listeriosis, siendo la cifra anual más alta de muertes notificadas desde 2008 (Madden et al., 2018)

En Colombia el consumo de productos cárnicos y lácteos son los de mayor demanda a su vez siendo los más relacionados con la transmisión con microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* (Muñoz et al., 2013). En el país son escasos los reportes. Se notificaron al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) las enfermedades transmitidas por alimentos ocasionadas hasta la semana epidemiológica número 16 de 2010, encontrándose cuatro brotes de listeriosis en el país (Muñoz et al., 2011).

En la semana epidemiológica 52 del año 2015, las notificaciones al Sivigila de casos de ETA fueron de 10.381 casos de ETA, implicados en 895 brotes. De los casos notificados en esta semana epidemiológica, el grupo con mayor susceptibilidad que registró, abarcó la edad de 10 a 14 años con el 15,7%. Se identificaron presencia de patógenos en 35 brotes de muestras biológicas y en 29 brotes se han identificado agentes patógenos procedentes de muestras de alimentos. A través de análisis microbiológico de las muestras se estableció la presencia de las siguientes bacterias patógenas agentes etiológicos de ETA: *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E.coli*, *Salmonella spp.*, *B. cereus*, entre otros (INS, 2015).

➤ ***Bacillus cereus***

Bacillus cereus es un bacilo Gram positivo esporulado, aerobio facultativo capaces de causar ETA's (Soni et al., 2018). Las endosporas de *B. cereus* son parcialmente resistentes a la pasteurización, deshidratación, radiación gamma y otros métodos físicos empleados en el procesamiento de alimentos (Grutsch et al., 2018).

Dentro del grupo de *Bacillus cereus* encontramos siete especies bastante relacionadas, la formación de sus esporas otorgan un nivel de patogenicidad variable. Las dos especies asociadas con ETA's son *B. cereus* sensu estricto y *B. cytotoxicus*, *B. anthracis* causante del ántrax, *B. thuringiensis* el cual es empleado como un bioinsecticida. *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis* relacionado con el deterioro de los alimentos. Las enterotoxinas generadas por *B. cereus* (s.s) son capaces de producir colitis; específicamente la enterotoxina no hemolítica, hemolisina BL y citotoxina K. Algunas cepas poseen la facultad de producir una toxina termoestable adicional llamada cereulida, que causa vomito (Frentzel et al., 2018).

La distribución geográfica de *Bacillus cereus* es extensa reportándose intoxicaciones en países como Estados Unidos, Finlandia, Noruega, Bulgaria, Reino Unido y Japón. En Colombia los reportes y registros son reducidos, se han reportado casos en Antioquia y Amazonas (Sánchez et al., 2016). Según el CDC en reciente reporte sobre los patógenas causantes del mayor número de ETA's en Estados Unidos; de 19 bacterias analizadas, *B. cereus* ocupa el puesto número 16. El Reino Unido ha sido el país que más reportes ha documentado sobre brotes por *B. cereus* es el Reino Unido, a través de un informe de su sistema de vigilancia se estableció que 43 brotes se presentaron en el periodo entre 1992 y 1999, sin embargo no se estableció la fuente de que alimentos estuvieron involucrados. En Colombia uno de los brotes importantes por *B. cereus* se presentó en Departamento del Tolima, donde en el año 2010 en un establecimiento penitenciario hubo 550 infectados por el consumo de arepa. A partir de los datos del Sivigila se considera a *B. cereus* la tercera causa de brotes en el país, siendo los alimentos listos para el consumo (LPC) no industriales involucrados con mayor frecuencia (MINSALUD, 2011).

El último brote presentado y reportado por ETA en Colombia, en la plataforma del INS y Sivigila del BES de la Semana 13 del año 2018, se dio el 3 de Abril en Norte de Santander. Se presentó una tasa de ataque del 100% con 9 pacientes afectados de una institución educativa. Se sospecha que el alimento posiblemente implicado fue avena-leche el cual se ofreció como refrigerio y alimento general. El periodo de incubación de este brote surgió entre una y cuatro horas posteriores al consumo generando síntomas como vómito y dolor abdominal. Los pacientes se atendieron y respondieron satisfactoriamente al tratamiento. Se realizó la investigación epidemiológica de campo, inspección, vigilancia y control. Los

resultados de las muestras de alimentos recolectadas se encuentran pendientes (INS, 2018).

4. METODOLOGIA

4.1. Cepas de Referencia

Cepas KWIK-STIK™: De la casa comercial Microbiologics; cada unidad KWIK-STIK™ contiene un sedimento liofilizado de una única cepa del microorganismo, un reservorio de líquido hidratante y un hisopo de inoculación. Cada dispositivo está sellado dentro de una bolsa laminada que contiene un secante para evitar la acumulación adversa de humedad (Microbiologics, 2016).

1. Nombre del microorganismo: *Staphylococcus aureus subsp. aureus*
Numero de catálogo: 0360
Número de lote: 360-78
Numero de referencia: ATCC® 25923™

Macroscopía: Colonias de tamaño mediano a grande, convexas, borde entero, coloración blancas y blancas pálidas, lisas, opacas, beta hemolíticas. *Microscopía:* Cocos Gram positivos que ocurren individualmente, en parejas y en racimos irregulares (Microbiologics, 2012).

2. Nombre del microorganismo: *Listeria monocytogenes (serotipo 4b)*.
Numero de catálogo: 0129
Número de lote: 19-61
Numero de referencia: ATCC® 13932™

Macroscopía: Colonias grandes, circulares, elevadas, un tipo de colonia tiene un borde completo y el otro un borde ondulado, coloración blanca pálida, reluciente, débilmente beta hemolítico. *Microscopía:* Bacilos cortos Gram positivos, rellenos con extremos redondeados (Microbiologics, 2012).

3. Nombre del microorganismo: *Bacillus cereus*
Numero de catálogo: 0200
Número de lote: 200-29
Numero de referencia: ATCC® 14579™

Macroscopía: Colonias grandes, circulares a irregulares, planas, borde ondulado, coloración gris, opacas, beta hemolíticas. *Microscopía:* Bacilo recto, Gram positivo, con una endospora terminal elipsoidal o esférica (Microbiologics, 2012).

4. Nombre del microorganismo: *Escherichia coli*
Numero de catálogo: 0335

Número de lote: 335-198

Numero de referencia: ATCC® 25922™

Macroscopía: 2 tipos de colonias, ambas son grises y beta hemolíticas: una es circular a irregular, convexa, ligeramente ondulada y suave; la otra es más grande, irregular, poco convexa, borde ondulado y rugoso. *Microscopía:* Bacilos rectos Gram negativos (Microbiologics, 2012).

5. Nombre del microorganismo: *Salmonella enterica subsp. enterica serovariedad typhimurium*

Numero de catálogo: 0363

Número de lote: 363-245

Numero de referencia: ATCC® 14028™

Macroscopía: Colonias medianas, coloración gris a blanco, circulares, bordes ligeramente irregulares y convexas. *Microscopía:* Bacilos rectos Gram negativos. (Microbiologics, 2012).

4.2. Activación de las cepas

El procedimiento de activación se llevó a cabo según las condiciones de uso dadas por el proveedor Microbiologics en el año 2016, en el documento de instrucciones de uso para LYFO DISK™, KWIK-STIK™ y KWIK-STIK™ plus; de la siguiente manera:

1. Dejar que la bolsa KWIK-STIK™ sin abrir se equilibre a temperatura ambiente. Después abrir la bolsa por la muesca y retirar la unidad KWIK-STIK™.
2. Tirar de la lengüeta para retirar la etiqueta y colocarla en la placa del cultivo principal o el registro de control de calidad. No desarme el dispositivo durante la hidratación.
3. Apretar (una sola vez) la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK™ (justo por debajo del menisco de líquido de la ampolla) situado en la tapa para así liberar el líquido hidratante.
4. Sujetando en posición vertical, golpee sobre una superficie dura para facilitar el flujo de líquido a través del eje hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento. Deje que el líquido hidratante fluya a través del eje del hisopo y hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento.

5. Apretando en la parte inferior de la unidad, triture el sedimento en el líquido hasta que la suspensión del sedimento sea homogénea.
6. DE INMEDIATO, sature muy bien el hisopo en el material hidratado y transfiera a un medio de cultivo con agar (Agar sangre de oveja al 5%, BD Columbia agar).
7. Inocular la placa del cultivo principal haciendo rodar el hisopo con suavidad sobre un tercio de la placa, igualmente para la cepa de reserva y trabajo.
8. Con un asa estéril, realice estrías para facilitar el aislamiento de las colonias.
9. Utilice un método de descarte de riesgo biológico adecuado para desechar las unidades KWIK-STIK™.
10. De inmediato, incube las placas del cultivo principal a la temperatura y condiciones adecuadas para los Microorganismos.

4.3 Requerimientos de cultivo y crecimiento para las cepas.

Con base al método # 1 del documento del proveedor Microbiologics, que lleva por nombre: Requerimientos de crecimiento recomendado para las cepas de los microorganismos en estudio; se estableció:

Método # 1: Realizar la activación en Agar de sangre de oveja no selectivo (BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood), el cual es un medio muy nutritivo de uso general para el aislamiento y el cultivo de microorganismos exigentes y no exigentes a partir de muestras clínicas. Bajo 35°C +/- 2°C en atmósfera aerobia durante 16 a 18 horas, las placas deben ser selladas a su alrededor con cinta de enmascarar o cinta parafilm.

Los procedimientos que se mencionan a continuación se realizan con base a metodologías planteadas en los trabajos de Herrera y Campos en el 2005, así como dos documentos del Laboratorio del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos del INVIMA, que son el anexo 19 PO06-SS-402-P001 del 2014 y el anexo 22 PO06-SS607-P001 del 2016 y los parámetros establecidos por la Norma ISO 17025 en su apartado de aseguramiento de la calidad de medios de cultivo y reactivos, adaptando las metodologías a los recursos, cepas y materiales disponibles del laboratorio.

4.4 Mantenimiento y conservación de las cepas de referencia.

Posteriormente a la activación de las cepas y pasado el tiempo de incubación 16 a 18 horas, proceder a conservar las cepas en refrigeración (2°C a 4°C) en la nevera elegida para el uso del cepario, procurando envolver con papel parafilm el alrededor de cada placa Petri que contiene la cepa, con el fin de evitar contaminaciones.

4.4.1 Mantenimiento y conservación de la Cepa Madre

Posterior a la activación la cepa madre debe refrigerarse bajo condiciones asépticas, sellando el alrededor de la caja de Petri con cinta de enmascarar o cinta parafilm, evitando cualquier posible contaminación de la misma. Esta cepa no debe emplearse a no ser que la cepa de reserva pierda viabilidad; de lo contrario no debe manipularse inadecuadamente.

Al transcurrir dos o tres meses; según corresponda, de conservación bajo refrigeración realizar un nuevo pase o transferencia, para generar una nueva cepa madre, a partir de estas cepas de referencia (cepa madre) es recomendado según la ATCC realizar solo 5 repiques, pases, transferencias o subcultivos a partir de la cepa madre.

4.4.2 Mantenimiento y conservación Cepa de Reserva y de Trabajo

A partir de la cepa de reserva tomar una asada de una colonia aislada e inocular siembra por agotamiento en una nueva caja de petri con agar sangre de oveja al 5%, atemperado previamente a 35°C. Proceder a incubar a 35°C durante 16 a 18 horas en aerobiosis.

Después de su uso para la preparación de las suspensiones en el control de calidad de los métodos de análisis del laboratorio, descartar adecuadamente las cepas de trabajo y todo el material contaminado en recipiente de riesgo biológico, para posteriormente ser desactivado en autoclave.

4.5 Viabilidad de las cepas

La viabilidad de las cepas se evalúa mediante el desarrollo del crecimiento y análisis de sus características macroscópicas típicas, a partir de la cepa de reserva a través de un subcultivo para obtener la cepa de trabajo. El crecimiento de la cepa de trabajo en agar sangre de cordero al 5% es evaluado y su resultado se registra en el formato Excel anexo: Formato Pruebas de Viabilidad, se da una conformidad en referencia a la viabilidad y características macroscópicas teóricas dadas en las fichas de información de cada cepa ATCC. La recuperación de las cepas se evalúa cualitativamente dando un criterio de cumplimiento o

incumplimiento en dado caso que el crecimiento sea ausente y se haya perdido la viabilidad.

En dado caso, si y solo si la cepa de reserva pierde viabilidad, debe realizarse un repique a partir de la cepa madre y así obtener una nueva cepa de reserva.

4.6 Control de Calidad de los Métodos de Análisis del Laboratorio

4.6.1 Control de Calidad Readycult Coliforms 100

1. Tomar 2 a 4 colonias aisladas de los microorganismos *E. coli* y *S. typhimurium*; suspender en 6 mL de solución salina 0.8% cada uno, para proceder a realizar un patrón de concentración conocido basándose en la lectura por espectrofotometría bajo una longitud de onda de 600 nm, ajustar a una absorbancia de +/- 0.132 que se relaciona a un patrón McFarland 0.5 (1.5×10^8 UFC/mL).
2. *Control positivo:* Inocular 1 mL de la dilución -6 de *E. coli* en 100 mL de agua destilada estéril adicionando una ampolleta de Readycult e incubar a 35°C durante 24 horas.
3. *Control negativo:* Inocular 1 mL de la dilución -6 de *S. typhimurium* en 100 mL de agua destilada estéril adicionando una ampolleta de Readycult e incubar a 35°C durante 24 horas.
4. Posteriormente al periodo de incubación observar el viraje del medio a color verde azulado y confirmar la presencia de *E. coli* adicionando reactivo de Kovac's y fluorescencia bajo luz UV, para un resultado indol positivo, a través de la formación de un anillo rojo ***E. coli* (+)**.
5. Realizar el mismo procedimiento para el control negativo y verificar la ausencia del viraje del medio y reacción indol negativa, ausencia de anillo rojo ***E. coli* (-)**.
6. Registrar los resultados en el formato correspondiente: Registro Controles del Cepario 2018.

4.6.2 Control de Calidad PETRIFILM 3M *E. coli*/Coliformes

1. Tomar 2 a 4 colonias aisladas de los microorganismos *E. coli* y *S. typhimurium*; suspender en 6 mL de solución salina 0.8% cada uno, para

proceder a realizar un patrón de concentración conocido basándose en la lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm, ajustar a una absorbancia de +/- 0.132 que se relaciona a un patrón McFarland 0.5 (1.5×10^8 UFC/mL).

2. Control positivo: Inocular 1 mL de la dilución -6 de *E. coli* en la placa Petrifilm *E. coli/Coliformes* e incubar a 35°C durante 24 horas.
3. Control negativo: Inocular 1 mL de dilución -6 de *B. cereus* en la placa Petrifilm *E. coli/Coliformes* e incubar a 35°C durante 24 horas.
4. Posteriormente al periodo de incubación observar el crecimiento en placa de colonias azules con formación de gas ***E. coli* (+)**.
5. Realizar el mismo procedimiento para el control negativo y verificar la ausencia de colonias azules con formación de gas ***E. coli* (-)**.
6. Registrar los resultados en el formato correspondiente registro controles del cepario 2018.

4.6.3 Control de Calidad Staph Express PETRIFILM 3M

1. Tomar 2 a 4 colonias aisladas de los microorganismos *S. aureus* y *E. coli*; suspender en 6 mL de solución salina 0.8% cada uno, para proceder a realizar un patrón de concentración conocida basándose en la lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm, ajustar a una absorbancia de +/- 0.132 que se relaciona a un patrón McFarland 0.5 (1.5×10^8 UFC/mL).
2. *Control positivo*: Inocular 1 mL de la dilución -6 de *S. aureus* en la placa Petrifilm 3M Staph Express e incubar a 35°C durante 24 horas.
3. *Control negativo*: Inocular 1 mL de la dilución -6 de *E. coli* en la placa Petrifilm 3M Staph Express e incubar a 35°C durante 24 horas.
4. Posteriormente al periodo de incubación observar el crecimiento en placa de colonias violetas ***S. aureus* (+)**.

5. Realizar el mismo procedimiento para el control negativo y verificar la ausencia de colonias violetas **S. aureus (-)**.
6. Registrar los resultados en el formato correspondiente: Registro Controles del Cepario 2018.

4.6.4 Agar BACARA recuento en placa *Bacillus cereus*

1. Tomar 2 a 3 colonias aisladas de los microorganismos *B. cereus* y *E. coli* y suspender en 6 mL de solución salina 0.8% cada uno, para proceder a realizar un patrón de concentración conocida basándose en la lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm, ajustar a una absorbancia de +/- 0.132 que se relaciona a un patrón McFarland 0.5 (1.5×10^8 UFC/mL).
2. *Control positivo:* Inocular 100 uL de la dilución -6 de *B. cereus* por siembra en superficie y extender con ayuda de un asa de hockey sobre una placa de agar BACARA, incubar a 35°C durante 24 horas.
3. *Control negativo:* Inocular 100 uL de la dilución -6 de *E. coli* por siembra en superficie y extender con ayuda de un asa de hockey sobre una placa de agar BACARA, incubar a 35°C durante 24 horas.
4. Posteriormente al periodo de incubación observar el crecimiento en placa de colonias grandes color rosa/anaranjadas rodeadas de un halo opaco **B. cereus (+)**.
5. Realizar el mismo procedimiento para el control negativo y verificar la ausencia de colonias grandes color rosa/anaranjadas **B. cereus (-)**.
6. Registrar los resultados en el formato correspondiente: Registro Controles del Cepario 2018.

4.6.5 Control de Calidad Aerobic Count Plate PETRIFILM 3M

1. Tomar 2 colonias aisladas del microorganismo *B. cereus*; suspender en 6 mL de solución salina 0.8%, para proceder a realizar un patrón de concentración conocida basándose en la lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm, ajustar a una absorbancia de +/- 0.132 que se relaciona a un patrón McFarland 0.5 (1.5×10^8 UFC/mL).

2. *Control positivo:* Inocular 1 mL de la dilución -6 de *B. cereus* en la placa Petrifilm 3M Aerobic Count Plate e incubar a 35°C durante 24 horas.
3. *Control negativo:* Inocular 1 mL de agua destilada estéril en la placa Petrifilm 3M Aerobic Count Plate e incubar a 35°C durante 24 horas.
4. Posteriormente al periodo de incubación observar el crecimiento en placa rojas **Aerobios mesófilos (+)**.
5. Realizar el mismo procedimiento para el control negativo y verificar la ausencia de colonias rojas **Aerobios mesófilos (-)**.
6. Registrar los resultados en el formato correspondiente registro controles del cepario 2018.

4.6.6 Control de Calidad Detección *Listeria monocytogenes*. VIDAS - LMX bioMérieux

1. Tomar 2 a 4 colonias aisladas de los microorganismos *L. monocytogenes* y *E. coli*; suspender en 6 mL de solución salina 0.8% cada uno, para proceder a realizar un patrón de concentración conocida, basándose en la lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm, ajustar a una absorbancia de +/- 0.132 que se relaciona a un patrón McFarland 0.5 (1.5×10^8 UFC/mL).
2. *Control positivo:* Inocular 1 mL de la dilución -6 de *L. monocytogenes* en 225 mL de caldo LMX suplementado e incubar a 35°C durante 26 a 30 horas.
3. *Control negativo:* Inocular 1 mL de la dilución -6 de *E. coli* en 225 mL de caldo LMX suplementado e incubar a 35°C durante 26 a 30 horas.
4. Posterior al periodo de incubación realizar el montaje del control positivo en el cartucho VIDAS-LMX adicionando 250 uL de muestra, llevar al Heat and Go por 5 minutos y dejar a temperatura ambiente por 10 minutos.
5. Realizar el mismo procedimiento del numeral 4 para el control negativo.

6. Cargar las muestras tanto del control positivo como negativo y prueba de esterilidad en el equipo VIDAS situando los conos con anterioridad y registrar en el software VIDAS- LMX *L. monocytogenes* Express, dando inicio al análisis.
7. Posterior al tiempo de análisis observar y registrar los resultados en el formato correspondiente: Registro Controles del Cepario 2018.

4.6.7 Control de Calidad Detección *Salmonella* spp. VIDAS - STP bioMérieux

1. Tomar 3 colonias aisladas de los microorganismos *S. Typhimurium* y *E. coli* y suspender en 6 mL de solución salina 0.8%, para proceder a realizar un patrón de concentración conocida, basándose en la lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm, ajustar a una abs de +/- 0.132 que se relaciona a un patrón McFarland 0.5 (1.5×10^8 UFC/mL).
2. *Control positivo:* Inocular 1 mL de la dilución -6 de *S. Typhimurium* en 225 mL de caldo APE suplementado e incubar a 35°C durante 18 horas.
3. *Control negativo:* Inocular 1 mL de la dilución -6 de *E. coli* en 225 mL de caldo APE suplementado e incubar a 35°C durante 18 horas.
4. Posteriormente al periodo de incubación realizar el montaje del control positivo en el cartucho VIDAS-STP adicionando 500 uL de muestra, llevar al Heat and Go por 5 minutos y dejar a temperatura ambiente por 10 minutos.
5. Realizar el mismo procedimiento del numeral 4 para el control negativo.
6. Cargar las muestras tanto en control positivo como negativo en el equipo VIDAS situando los conos con anterioridad y registrar en el software VIDAS- UP *Salmonella*, dando inicio al análisis.
7. Posterior al tiempo de análisis observar y registrar los resultados en el formato correspondiente: Registro Controles del Cepario 2018.

4.7 Evaluación de la esterilidad de los medios de cultivo

A través de la prueba de esterilidad se busca determinar la presencia de contaminaciones microbianas en los medios y métodos de análisis con el fin de demostrar que el producto examinado es estéril. La evaluación de la esterilidad de

los medios y caldos de cultivo se lleva a cabo mediante la incubación de una unidad del medio sin inóculo a la temperatura adecuada 35°C. Posterior al periodo de incubación los medios y caldos deben permanecer estériles sin crecimiento alguno, sin turbidez o cambios físicos visibles. Los resultados se registran en el formato Excel Archivo anexo, Registro Controles del Cepario 2018.

4.8 Evaluación de la productividad cualitativa de los métodos de análisis

Mediante esta medición determinamos cualitativamente la productividad y recuperación de los microorganismos en los métodos de recuento en placa (Petrifilm 3M y BACARA Agar bioMérieux), se emplea la clasificación del crecimiento en placa de la siguiente manera: 0: Ausencia de crecimiento, 1: Crecimiento débil y 2: Crecimiento bueno, en comparación al patrón de concentración conocida inoculado McFarland 0.5 dilución -6. Los resultados se registran en el formato Excel: Registro controles del Cepario 2018.

Para los métodos cualitativos como Readycult Coliforms 100, VIDAS *Salmonella* y VIDAS *Listeria monocitogenes*; la evaluación se realiza cualitativamente con base en la presencia o ausencia del microorganismo posterior al periodo de incubación y al tiempo de análisis.

4.9 Evaluación de la selectividad de los métodos de análisis.

La selectividad de los métodos se evalúa mediante la inoculación de un control negativo (cepa “no target”) empleando las cepas de referencia disponibles en el laboratorio. El control negativo se trata de un microorganismo el cual se conoce no posee la facultad de desarrollarse en medios con agentes selectivos para el mismo, este agente selectivo inhibe el crecimiento del microorganismo “no target”; por lo cual se establece que el medio y su componente selectivo inhiben la microbiota acompañante en el procesamiento de una muestra.

Petrifilm 3M Staph Xpress:

Control Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

Petrifilm 3M E. coli/Coliformes:

Control Negativo: *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Petrifilm 3M Aerobic Plate Count:

Control Negativo: *Agua Destilada Estéril*.

Readycult Coliforms 100

Control Negativo: *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028.

VIDAS - LMX bioMérieux

Control Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

VIDAS - APE bioMérieux

Control Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD/ FECHA	FEBRERO 2018	MARZO 2018	ABRIL 2018	MAYO 2018	JUNIO 2018
Inducción al laboratorio de Microbiología					
Preparación de material y medios de cultivo					
Diligenciamiento de Formatos control de calidad de autoclaves, control de preparación de medios de cultivo					
Análisis microbiológico de agua potable					
Análisis microbiológico de producto terminado, materias primas cárnicas y no cárnicas.					
Análisis microbiológico de Patógenos en equipo VIDAS					
Análisis microbiológico de Superficies					
Análisis Microbiológico de ambientes					
Análisis microbiológico superficies <i>Listeria</i> e indicadores					
Análisis microbiológico de estabilidades y seguimientos					
Análisis microbiológico de manipuladores					
Controles internos del Laboratorio					
Revisión y desarrollo para la realización y continuación del cepario					
Activación de cepas					
Revisión bibliográfica					
Control de Calidad Métodos de Análisis y medios de Cultivo					
Desarrollo trabajo escrito					

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 Activación de las Cepas

Posterior al procedimiento de activación e incubación durante 16 a 18 horas a 35°C +/- 2°C en aerobiosis de las cepas de referencia, se determinó las características macroscópicas con el objeto de ser equivalentes y congruentes con la macroscopía teórica especificada por la casa comercial Microbiologics en el

documento Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release. A partir de este análisis macroscópico consignado en el formato Excel Anexo: Formato Pruebas de Viabilidad; donde podemos evidenciar que la activación de los microorganismos el día 13/03/2018 en agar sangre de conejo al 5% fue exitosa.



Imagen 1. Agar Sangre de Cordero al 5% de la casa comercial bioMérieux empleado para la activación y mantenimiento de las cepas.

El Agar Sangre de Cordero al 5% o agar Columbia posee los nutrientes necesarios para la activación de las cepas, sus componentes nutritivos proveen a los microorganismos de condiciones óptimas de crecimiento posterior a la activación de un liofilizado. El Agar Columbia fue descrito por Ellner y otros autores, este medio de aislamiento facilita el crecimiento de microorganismos exigentes como por ejemplo *Listeria* spp. La sangre de cordero constituye el aporte nutritivo más alto, seguido de la adición de peptonas, en donde se desarrollan la mayoría de especies bacterianas sin importar su metabolismo específico. A través del uso de este medio de cultivo podemos evaluar a su vez la capacidad hemolítica de una bacteria.

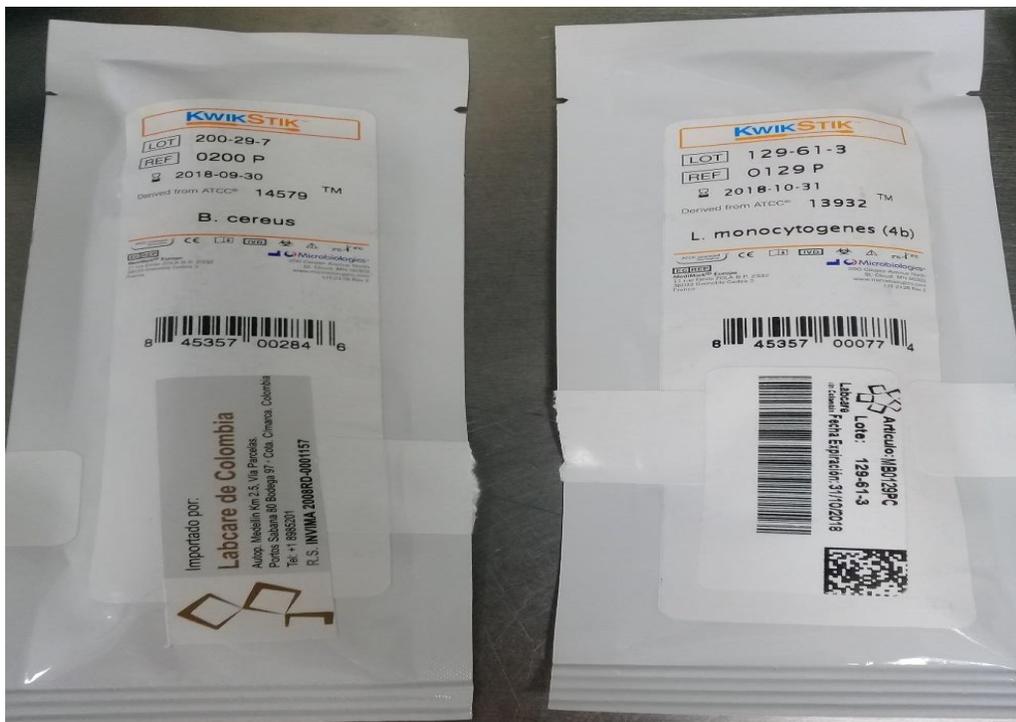


Imagen 2. Unidades KWIKSTIK Microbiologics. *Bacillus cereus* ATCC 14579 (izquierda), *Listeria monocytogenes* (4b) ATCC 13932 (derecha).

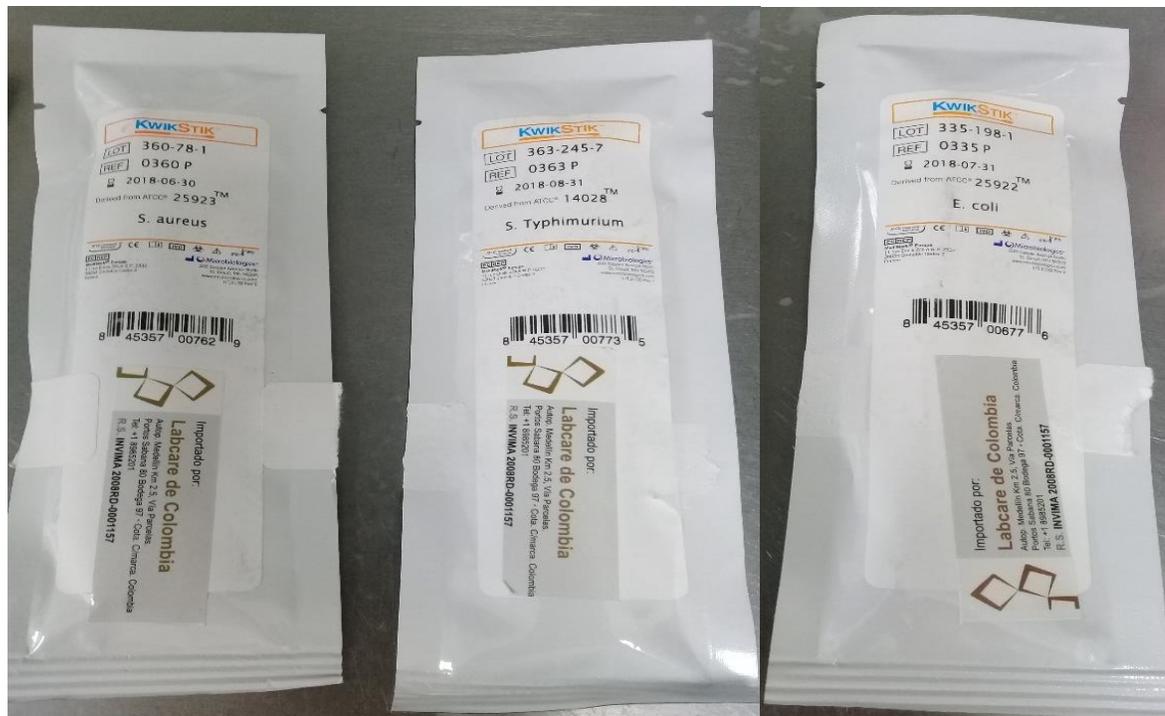


Imagen 3. Unidades KWIKSTIK Microbiologics. De izquierda a derecha: *S. aureus* ATCC 25923, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *E. coli* ATCC 25922.

Para la activación de las cepas se atemperaron los medios con anterioridad (35°C) para facilitar la adaptación de las cepas al nuevo medio de cultivo. Se realizaron siembras por agotamiento utilizando el hisopo con el liofilizado activo bacteriano y asas estériles descartables. Se realizan de cada cepa tres siembras denominándose de la siguiente manera: Cepa Madre, Cepa de Reserva y Cepa de trabajo; en donde a partir de la cepa de Reserva se realizan los repiques semanales generando cepas de trabajo utilizadas en el control de calidad del laboratorio y la cepa Madre que solo debe manipularse en dado caso que la cepa de reserva pierda viabilidad, se contamine o presente cambios fenotípicos evidentes en su macroscopía.



Imagen 4. Activación de la cepa de *E.coli* ATCC 25922 en agar sangre de cordero al 5%.



Imagen 5. Activación de la cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028 en agar sangre de cordero al 5%.



Imagen 6. Activación de la cepa *S. aureus* ATCC 2592 en agar sangre de cordero al 5%.



Imagen 7. Activación de la cepa *L. monocytogenes* ATCC 13932 en agar sangre de cordero al 5%.

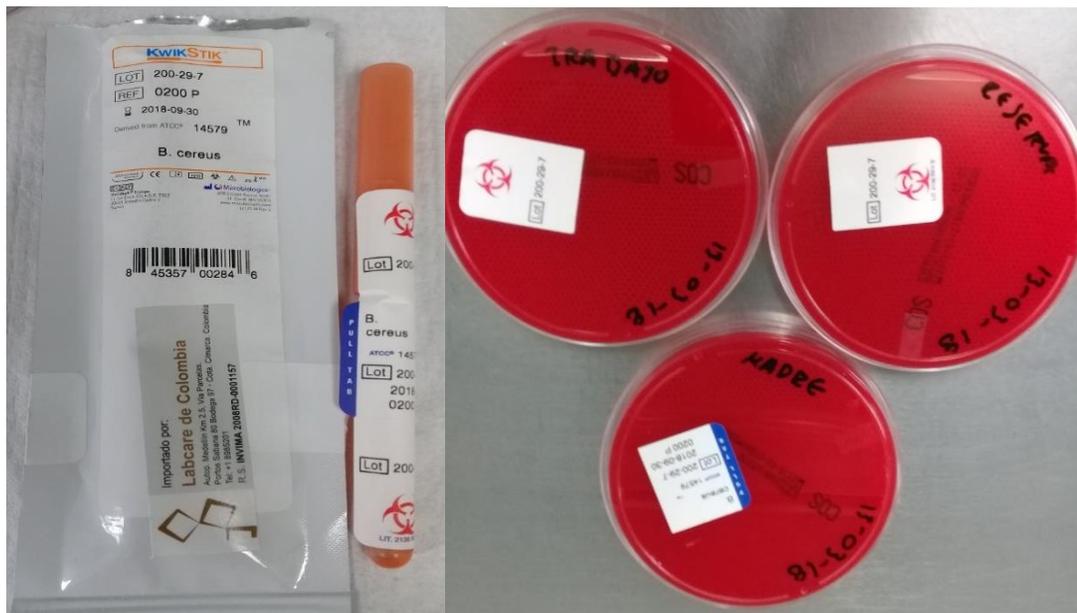


Imagen 8. Activación de la cepa de *B. cereus* ATCC 14579 en agar sangre de cordero al 5%.



Imagen 9. Incubación de las cepas de referencia a 35°C +/- 2°C.

La incubación se llevó a cabo en una incubadora previamente limpia y estéril, dispuesta solo para las cepas y el control de calidad de los métodos del laboratorio bajo condiciones aerobias a 35°C +/- 2°C. El tiempo de incubación fue de 16 a 18 horas.

Tabla 1. Activación de las cepas con fecha 13/03/2018 con su correspondiente caracterización macroscópica.

Cepa	Fecha Activación	Características Macroscópicas		Medio de cultivo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	13/03/2018	Grises circulares a irregulares	Color/Forma	Agar sangre de cordero al 5% Columbia
		Mediano a grande	Tamaño	
		ondulado y rugoso	Borde	
		Lisa reluciente	Textura	
		Convexa	Elevación	
SI	Beta Hemolítica			
<i>Salmonella enterica</i> <i>subsp. Enterica</i> <i>serovar Typhimurium</i> ATCC 14028	13/03/2018	Gris/blancas circulares	Color/Forma	
		Pequeñas a medianas	Tamaño	
		Ligeramente irregulares	Borde	
		Suave cremosa	Textura	
		Convexa	Elevación	
SI	Beta			

			Hemolítica
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i> ATCC 25923	13/03/2018	Blancas pálidas circulares	Color/Forma
		Mediano a grande	Tamaño
		Entero	Borde
		Lisa opaca	Textura
		Convexa	Elevación
		SI	Beta Hemolítica
<i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932	13/03/2018	Blanco pálido circulares	Color/Forma
		Pequeñas a medianas	Tamaño
		Completo y ondulado	Borde
		Lisa reluciente	Textura
		Levantada	Elevación
		SI, débilmente	Beta Hemolítica
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	13/03/2018	Grises opacas circulares irregulares	Color/Forma
		Grandes	Tamaño
		Ondulado	Borde
		Rugosa	Textura
		Planas	Elevación
		SI	Beta Hemolítica

Tras la activación y evaluación de las características macroscópicas de las cepas y en comparación con los datos teóricos dados por la casa comercial se pudo concluir que los datos recolectados contra los teóricos coinciden y la activación se llevó a cabo correctamente.

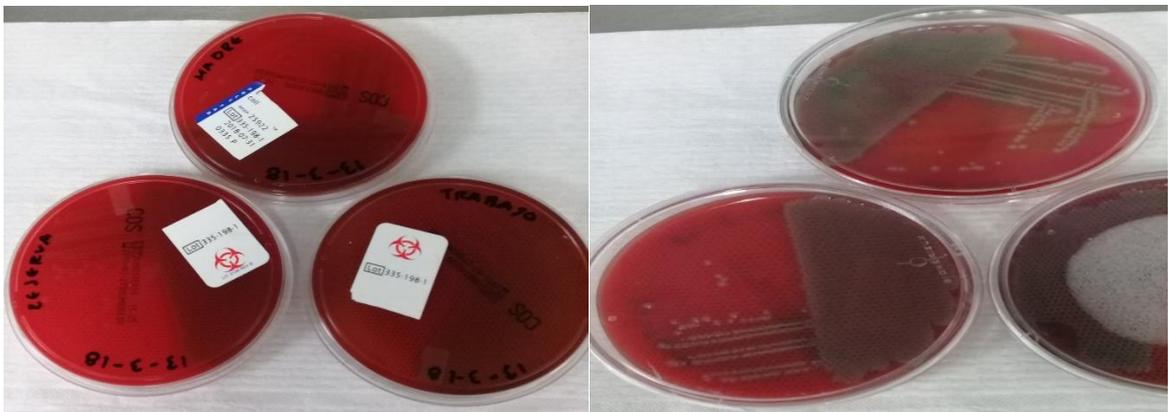


Imagen 10. Cepa de *E. coli* ATCC 25922 activa en Agar sangre de cordero al 5%.



Imagen 11. Macroscopía de E. coli ATCC 25922 en agar sangre de cordero al 5%: 2 tipos de colonias, ambas son grises y beta hemolíticas: una es circular a irregular, convexa, ligeramente ondulada y suave; la otra es más grande, irregular, poco convexa, borde ondulado y rugoso.

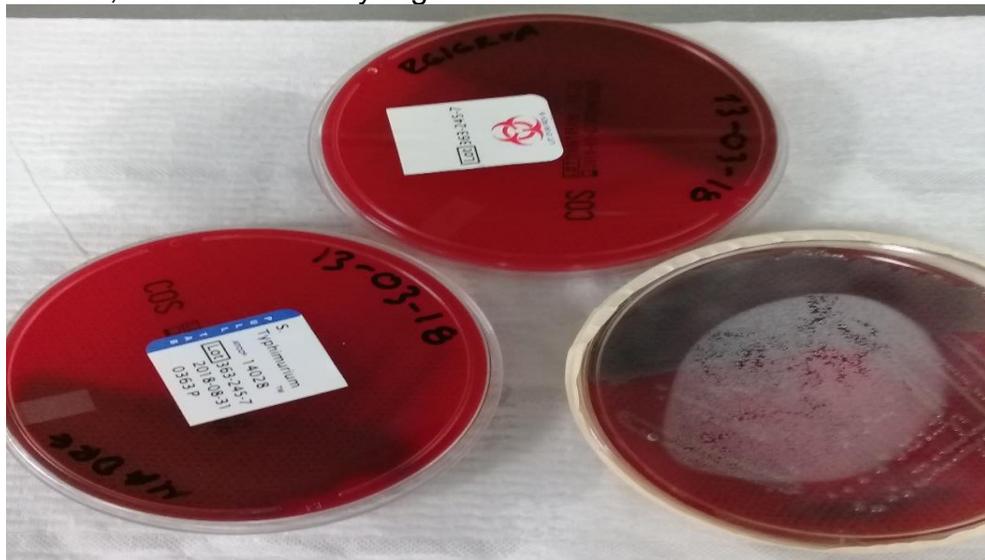


Imagen 12. Cepa de Salmonella Typhimurium ATCC 14028 en agar sangre de cordero al 5%.

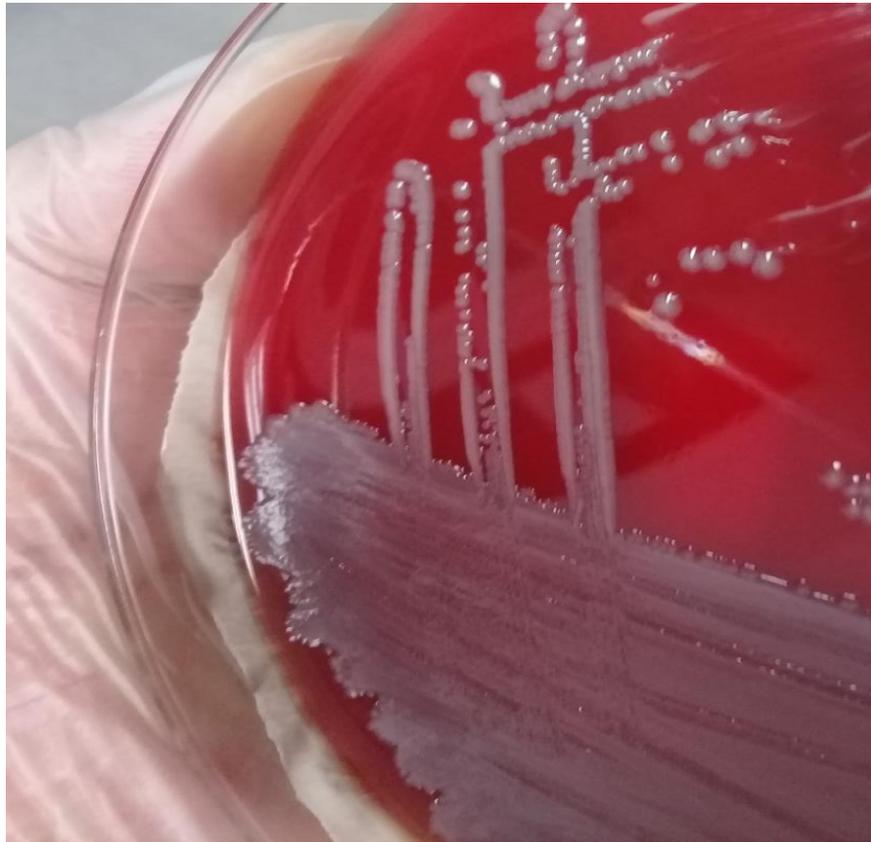


Imagen 13. Macroscopía de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 en sangre de cordero al 5%: Colonias medianas, coloración gris a blanco, circulares, bordes ligeramente irregulares y convexas.

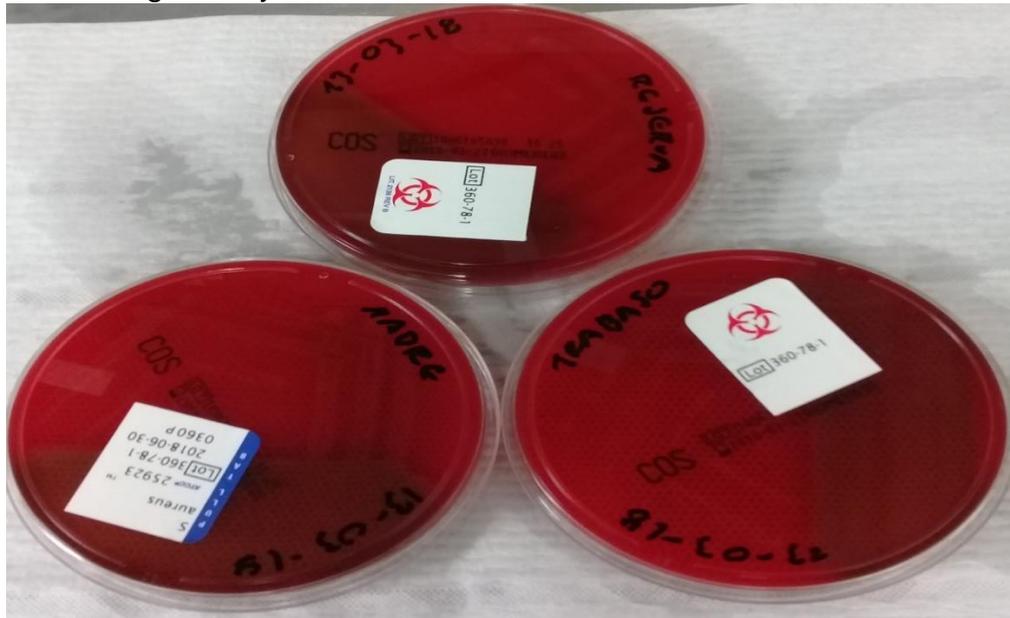


Imagen 14. Cepa de *S. aureus* ATCC 25923 en agar sangre de cordero al 5%.



Imagen 15. Macroscopía de *S. aureus* ATCC 25923 en agar sangre de cordero al 5%: Colonias de tamaños medianos a grande, convexas, borde entero, coloración blanca y blancas pálidas, lisas, opacas, beta hemolíticas.

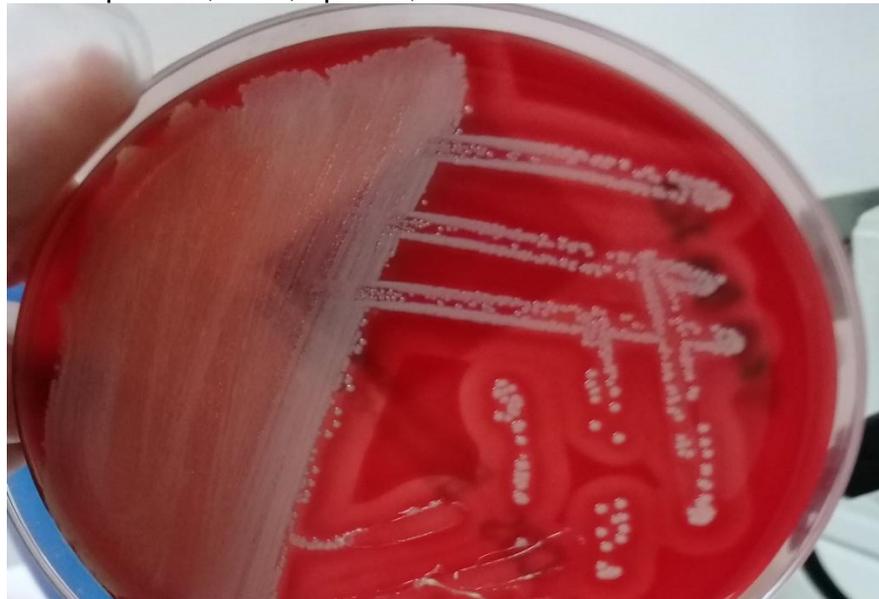


Imagen 16. Beta-Hemolisis de *S. aureus* ATCC 25923 en agar sangre de conejo al 5%.

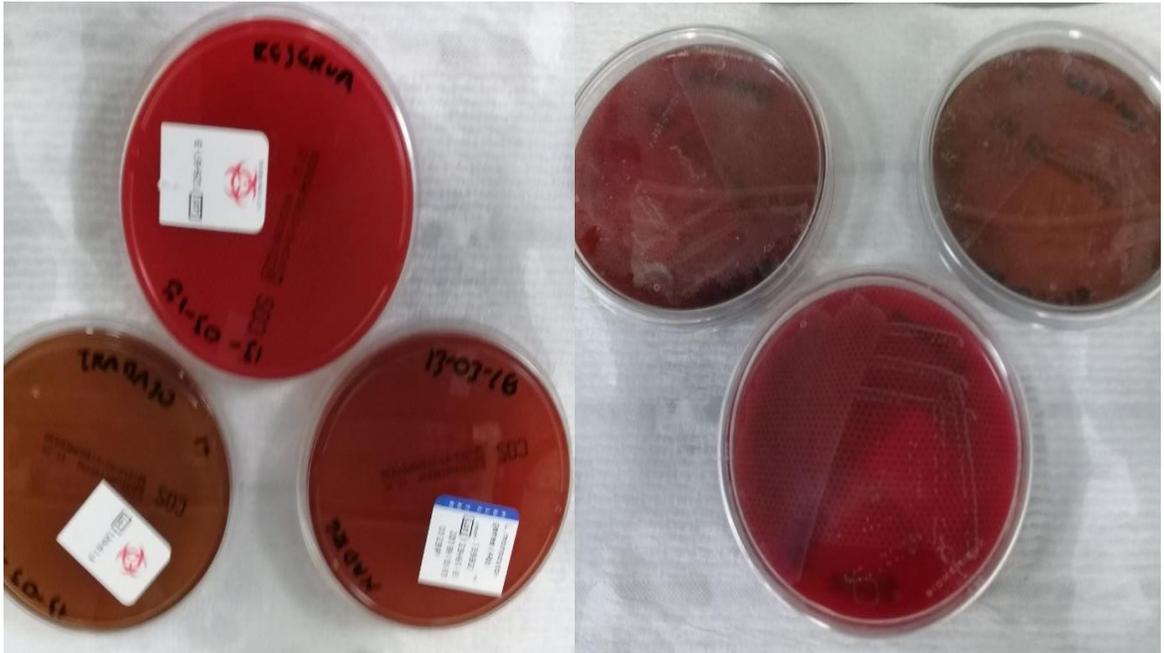


Imagen 17. Cepa de *L. monocytogenes* ATCC 13932 en agar sangre de cordero al 5%.

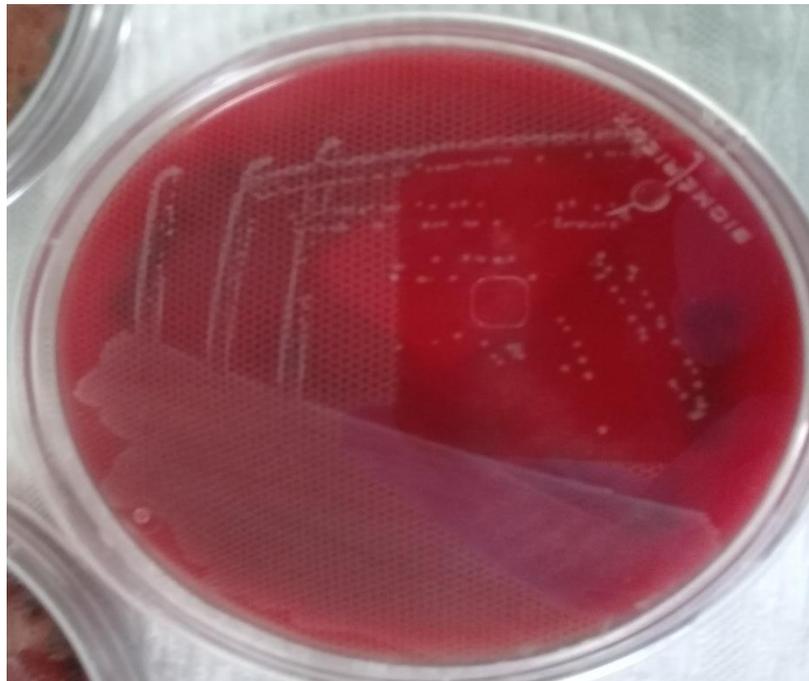


Imagen 18. Macroscopía de *L. monocytogenes* ATCC 13932 en agar sangre de cordero al 5%: Colonias medianas a grandes, circulares, elevadas, un tipo de colonia tiene un borde completo y el otro un borde ondulado, coloración blanca pálida, reluciente, débilmente beta hemolítico.

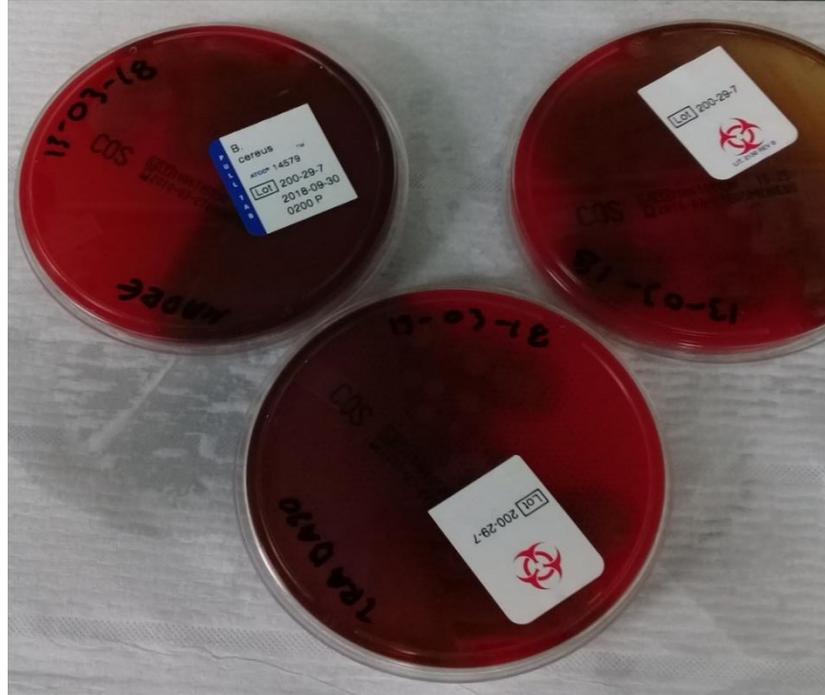


Imagen 19. Cepa de *Bacillus cereus* ATCC 14579 en agar sangre de cordero al 5%.

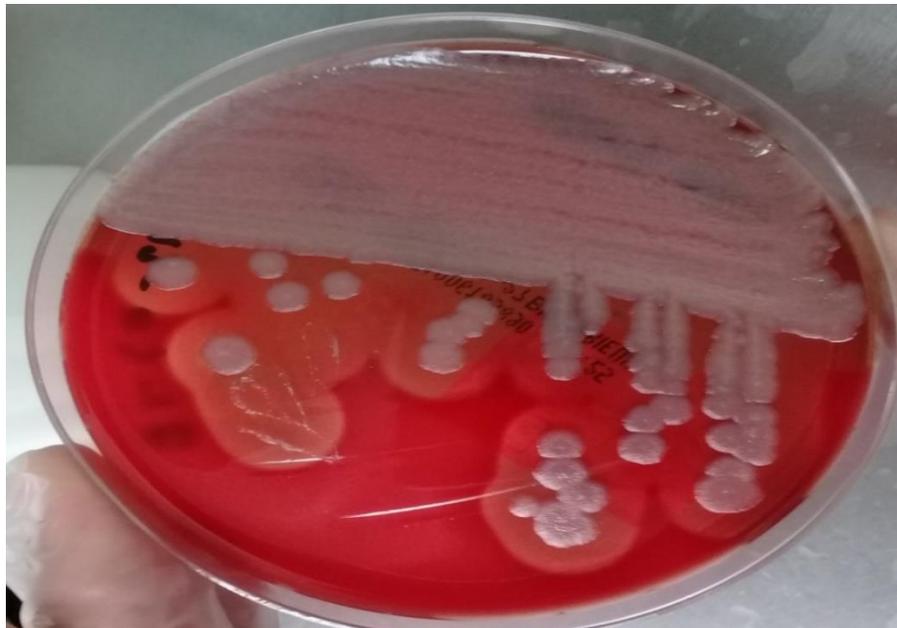


Imagen 20. Macroscopía de *B. cereus* ATCC 14579 en agar sangre de conejo al 5%: Colonias grandes, circulares a irregulares, planas, borde ondulado, coloración gris, opacas, beta hemolíticas.



Imagen 21. Beta-Hemolisis de *B. cereus* ATCC 14579 en agar sangre de conejo al 5%.

6.2 Viabilidad y Pureza de las Cepas

A la fecha 14/06/2018 Semana 24, las cepas se conservan bajo refrigeración (2°C a 4°C) y mantienen mediante transferencia periódica, el comportamiento metabólico y la macroscopía típica en agar sangre de cordero al 5%, no ha sufrido variaciones durante los subcultivos realizados para generar cepas de trabajo, a partir de las cuales se evalúa la viabilidad y macroscopía siendo constante a través del tiempo transcurrido. Desde el DIA 0: 13/03/2018 Semana 10, hasta la fecha 14/06/2018 Semana 24. Las cepas permanecen viables, sin cambios macroscópicos y metabólicos.

El día 18/04/2018 se realizó un repique a partir de la cepa madre de *Salmonella typhimurium* debido a un cambio brusco de temperatura en la nevera del cepario lo que condujo a la congelación del medio de cultivo con la cepa madre, el día 29/05/2018 se realizaron dos repiques a partir de las cepas madres de *B. cereus* y *E. coli* para generar nuevas cepas de reserva debido a la pérdida de viabilidad de las cepas de reserva empleadas con anterioridad; se incubó y posterior se evaluaron sus características macroscópicas siendo acordes a las planteadas en el documento de Microbiologics, siendo equivalentes.

La cepa de reserva debe manipularse con mucha precaución para evitar contaminaciones y cambios fenotípicos; por esta razón solo debe manipularse al momento de realizar el repique para generar la cepa de trabajo que se emplea cada semana para realizar el control de calidad de los lotes empleados para los métodos de análisis del laboratorio. La temperatura de refrigeración debe ser constante y uniforme para que la viabilidad de la cepa de reserva se mantenga hasta un periodo de 30 a 90 días. Cambios bruscos de temperatura pueden afectar directamente la viabilidad de la célula. Posterior a los 60 o 90 días si se observa la pérdida de la viabilidad o cambios fenotípicos de las cepas debe de generarse una nueva cepa de reserva a partir de la cepa madre.

Es necesario realizar revisiones periódicas semanales para evaluar las características de las cepas y el medio de cultivo debido a que este último puede sufrir deshidratación o pérdida de nutrientes, así como acumulación de metabolitos tóxicos excretados por los microorganismos al medio de cultivo, en este caso es necesario realizar una nueva cepa de reserva partir de la cepa madre. En dado caso que la pérdida de viabilidad sea evidente al momento de generar la cepa de trabajo, se debe realizar una nueva siembra y evaluar la viabilidad de la misma, si permanece inviable realizar un pase a partir de la cepa madre para generar una nueva cepa de reserva.

6.3 Pureza

Actualmente bajo el proceso de mantenimiento y conservación las cepas se encuentran libres de contaminaciones; sin embargo en la semana 20, día 15, mes 5 del año 2018 se realizó la transferencia a nuevos cultivos para generar nuevas cepas de reserva debido la presencia de contaminación en los cultivos de reserva de *E. coli* y *S. typhimurium* puede deberse a la transferencia periódica semanal de colonias lo que la hace propensa a que los cultivos se contaminen con mayor facilidad debido al manejo continuo.

6.4 Control de Calidad de los Métodos de Análisis del Laboratorio

6.4.1 Evaluación de la Esterilidad

A través de los resultados para la evaluación de la esterilidad, se verifica la ausencia de microorganismos viables capaces de desarrollarse y multiplicarse; los cuales pueden llegar a los medios como agentes biológicos contaminantes y alterantes tanto del medio o método; como de los resultados que se esperan a través del empleo de los mismos.

Los resultados de la prueba de esterilidad son satisfactorios evidenciando la ausencia de crecimiento microbiano en medios estériles sin inóculo, bajo incubación a 35°C; estos resultados por semana, medio de cultivo y lote se

pueden apreciar en el formato Excel Anexo: Registro controles del Cepario 2018, en la casilla de esterilidad.

6.4.2 Verificación de los Métodos de Análisis y Medios de Cultivo

A la fecha actual se han realizado 6 controles de calidad de los métodos de análisis del laboratorio, teniendo en cuenta parámetros de productividad y selectividad cualitativa; realizando el control por lotes abiertos por semana, cada método y/o medio de cultivo.

A través de la realización de los controles se establece un procedimiento y se estandariza un patrón de concentración conocida para realizar las suspensiones diluidas empleadas como inóculo de los medios de cultivo en su control de Calidad; este patrón se realizó mediante espectrofotometría donde una absorbancia de +/-0.132 se relaciona con una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL equivalente a un patrón McFarland 0.5.

A través de los resultados consignados en el archivo Excel Anexo: Registro Controles del Cepario 2018; se verifica acertadamente que los métodos de análisis y medios de cultivo son eficientes y confiables en el uso diario para el análisis microbiológico del laboratorio en la planta de alimentos.

6.4.3 Evaluación Cualitativa de la Productividad y Selectividad de los Métodos de análisis.

6.4.3.1 Control de Calidad Readycult Coliforms 100



Imagen 22. Control de Calidad Readycult Coliforms 100. De izquierda a derecha Control positivo: *E. coli* ATCC 25922, Control negativo: *S. typhimurium* ATCC 14028 y prueba de esterilidad.

A partir de las suspensiones de los microorganismos en cuestión y empleando la dilución -6 se procedió a inocular 1 mL de cada microorganismo adicionando una ampolleta de Readycult en agua destilada estéril, inmediatamente se llevó a incubación a 35°C +/-2°C durante 24 horas.

Productividad

El rendimiento y recuperación de los microorganismos control evaluado a través de su crecimiento en el medio Readycult Coliforms 100. Para el control positivo *E. coli* ATCC 25922, y el Readycult al ser un método cualitativo su resultado fue de Presencia. Durante los controles realizados se observa el viraje del medio de cultivo a azul verdoso con la reacción positiva al indol formándose un anillo color rojo, crecimiento típico de *E. coli* en Readycult coliforms 100.

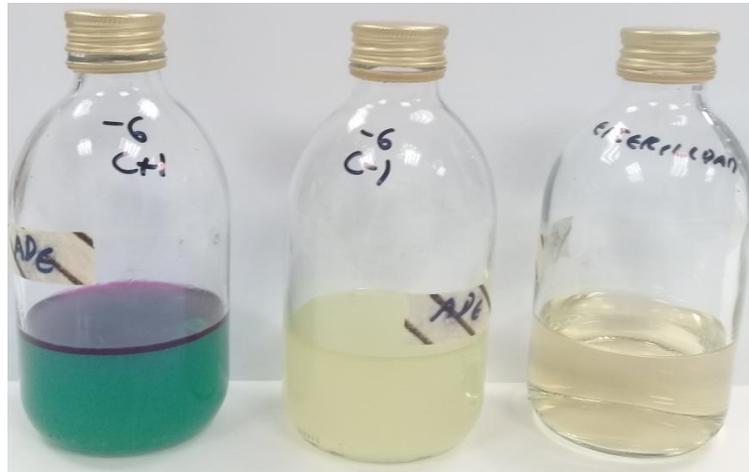


Imagen 23. Control de Calidad Readycult Coliforms 100 posterior a incubación. De izquierda a derecha, Control positivo: *E. coli* ATCC 25922: Presencia, Control negativo: *S. Typhimurium* ATCC 14028: Ausencia, y Prueba de esterilidad: Cumple.

El medio Readycult Coliforms 100 posee una fuente nutricional elevada consiste en peptonas y un tampón fosfato que garantizan el rápido crecimiento de Coliformes, posee un agente selectivo el laurilsulfato el cual inhibe el crecimiento de microbiota acompañante, especialmente la Gram positiva. A través del sustrato cromogénico X-GAL y el sustrato fluorogénico MUG es posible la detección simultánea de Coliformes y *E. coli*. Como se observa posterior a la incubación una coloración azul-verdosa me indica la presencia de coliformes; *E. coli* indol positivo y emisión de fluorescencia bajo luz UV (365nm).

Selectividad

El medio Readycult en su ficha de datos, en el control de calidad nos especifica que debemos emplear como control Negativo a *Salmonella typhimurium* ATCC

14028, la cual se desarrolla en el medio de cultivo generando turbidez pero no produce viraje del medio y su reacción al indol es negativa.

6.4.3.2 Control de Calidad PETRIFILM 3M *E. coli*/Coliformes

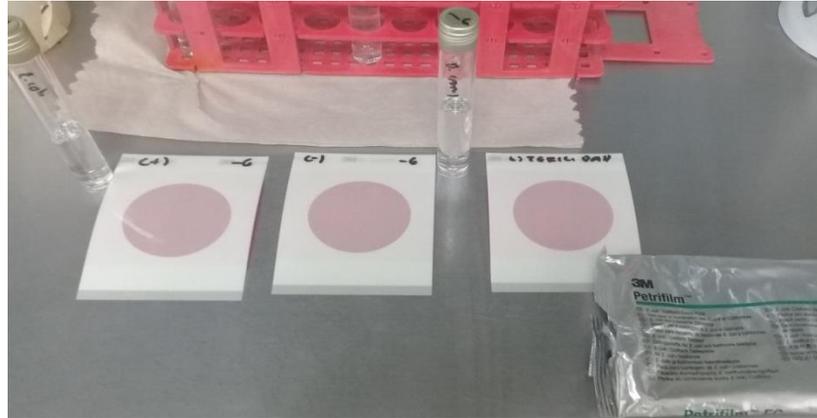


Imagen 24. Control de Calidad Petrifilm 3M *E. coli*/ coliforms. De izquierda a derecha Control positivo: *E. coli* ATCC 25922, Control negativo: *B. cereus* ATCC 14579 y prueba de esterilidad.

Productividad

El rendimiento y recuperación de *E. coli* ATCC 25922 como microorganismo control positivo a través del crecimiento en el medio Petrifilm 3M *E. coli*/Coliformes se clasifica con un score de 2: Crecimiento bueno, en cuanto al desarrollo y características macroscópicas de las colonias en el medio, *E. coli* tuvo un desarrollo macroscópico con colonias azules con producción de gas, acorde con las especificaciones de la casa comercial 3M del medio de cultivo. La recuperación del medio fue buena con referencia al patrón McFarland 0.5.

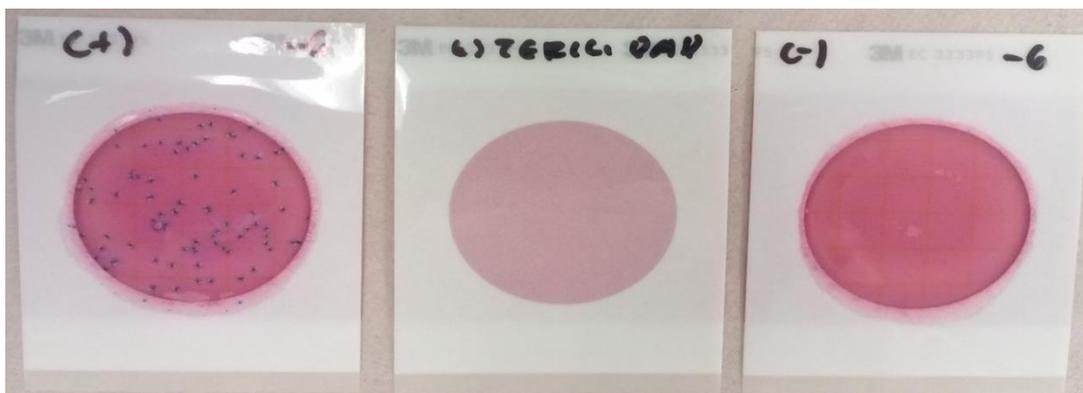


Imagen 25. Control de Calidad Petrifilm 3M *E. coli*/ coliforms posterior a la incubación. De izquierda a derecha Control positivo: *E. coli* ATCC 25922: 81×10^6 UFC/mL, Prueba de Esterilidad: Cumple y Control negativo: *B. cereus* ATCC 14579: 0 UFC/mL.

Se puede apreciar la formación de gas producto de la fermentación de la lactosa por *E. coli* y Coliformes. Cerca del 95% de las *E. coli* son productoras de gas el cual queda atrapado en la placa Petrifilm. La producción de la beta-glucoronidasa, la cual está presente en el 97% de las *E. coli*, se ve reflejado por un indicador lo cual conlleva a la precipitación azul de la colonia.

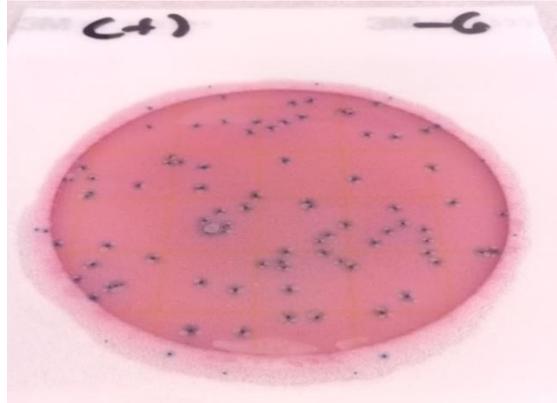


Imagen 26. *E. coli* ATCC 25922 dilución 10^{-6} en medio Petrifilm 3M *E. coli*/Coliforms. Crecimiento típico con Colonias azules con producción de gas.

Selectividad

Empleando como microorganismo “No Target” es decir control negativo a *B. cereus* ATCC 14579; la ausencia de crecimiento del microorganismo visible mediante recuentos en todos los controles realizados me indican que el medio Selectivo Petrifilm 3M *E. coli*/Coliformes inhibe el desarrollo de microorganismos Gram positivos que puedan estar presentes como microbiota acompañante en una muestra real.

6.4.3.3 Control de Calidad Staph Express PETRIFILM 3M

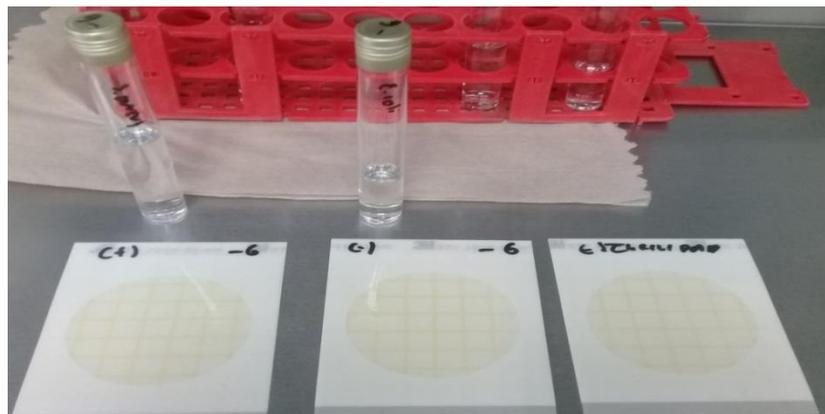


Imagen 27. Control de Calidad Petrifilm 3M Staph Express. De izquierda a derecha Control positivo: *S. aureus* ATCC 25923, Control negativo: *E. coli* ATCC 25922 y Prueba de esterilidad.

Productividad

El rendimiento y recuperación de *S. aureus* ATCC 25923 como microorganismo control positivo a través del crecimiento en el medio Petrifilm 3M Staph Express se clasifica con un score de 2: Crecimiento bueno, en cuanto al crecimiento y características macroscópicas del medio en donde *S. aureus* tuvo un desarrollo macroscópico con colonias violetas características típicas de *S. aureus* coagulasa positivo, acorde con las especificaciones de la casa comercial 3M del medio de cultivo. La recuperación del medio fue buena con referencia al patrón McFarland 0.5.

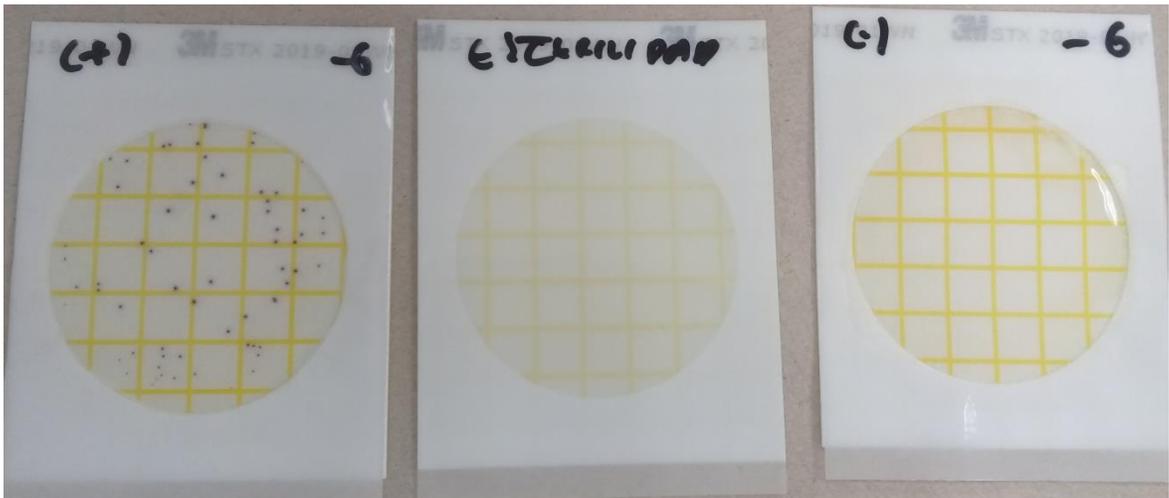


Imagen 28. Control de Calidad Petrifilm 3M Staph Express posterior a la incubación. De izquierda a derecha Control positivo: *S. aureus* ATCC 25923: 75×10^6 UFC/mL, Prueba de Esterilidad: Cumple y Control negativo: *E. coli* ATCC 25922: 0 UFC/mL.

Las Placas Petrifilm Staph Express son específicas para el recuento de *Staphylococcus aureus*, este consiste en un medio modificado cromogénico Baird-Parker siendo selectivo y diferencial para el *Staphylococcus aureus*. Se pueden apreciar las colonias rojo-violeta en la placa siendo positivo para el crecimiento de *S. aureus*.



Imagen 29. *S. aureus* ATCC 25923 dilución -6 en medio Petrifilm 3M Staph Express. Crecimiento típico con Colonias violetas *S. aureus* Coagulasa (+).

Selectividad

Empleando como microorganismo "No Target" *E. coli* ATCC 25922; se observó la ausencia de crecimiento del microorganismo visible mediante recuentos en todos los controles realizados. Esta información indica que el medio Selectivo Petrifilm 3M Staph Express inhibe el desarrollo de microorganismos Gram negativos que puedan estar presentes como microbiota acompañante en una muestra real.

6.4.3.4 Agar BACARA bioMérieux recuento en placa *Bacillus cereus*

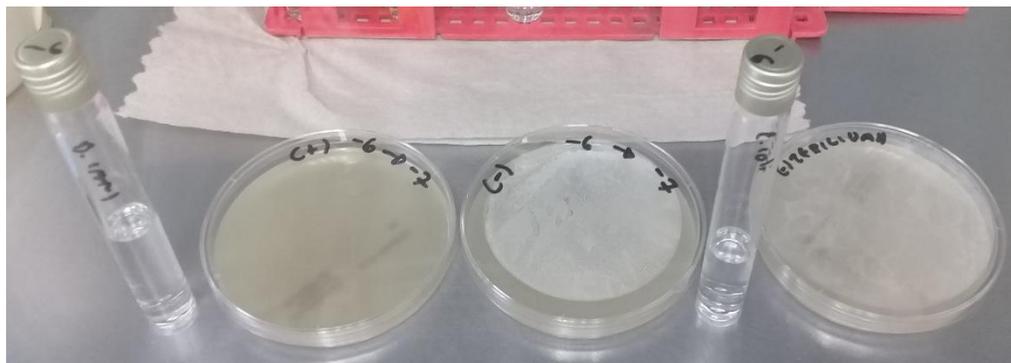


Imagen 30. Control de Calidad Agar Bacara bioMérieux. De izquierda a derecha Control positivo: *B. cereus* ATCC 14579, Control negativo: *E. coli* ATCC 25922 y Prueba de esterilidad.

Productividad

El rendimiento y recuperación de *Bacillus cereus* ATCC 14579 como microorganismo control positivo a través del crecimiento en el medio BACARA Agar bioMérieux se clasifica con un score de 2: Crecimiento bueno, en cuanto al crecimiento y características macroscópicas del medio en donde *B. cereus* tuvo un desarrollo macroscópico con colonias grandes color rosa/anaranjadas rodeadas de un halo opaco, acorde con las especificaciones sobre el crecimiento de *B. cereus* en este medio de cultivo de la casa comercial bioMérieux. La recuperación del medio fue buena con referencia al patrón McFarland 0.5



Imagen 31. Control de Calidad Agar Bacara bioMérieux. De izquierda a derecha Control positivo: *B. cereus* ATCC 14579: 5×10^7 UFC/mL, Control negativo: *E. coli* ATCC 25922: 0 UFC/mL y prueba de esterilidad: Cumple.

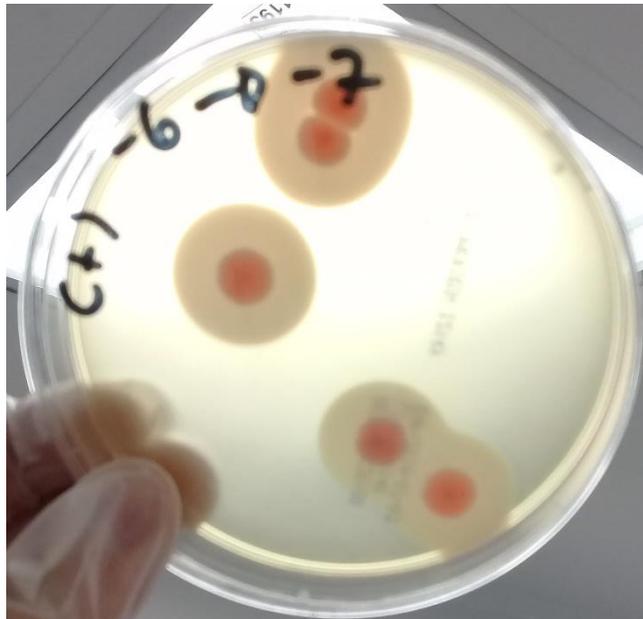


Imagen 32. *B. cereus* ATCC 14579 dilución 10^{-6} en medio Agar BACARA. Crecimiento típico con Colonias grandes color rosa/anaranjadas rodeadas de un halo opaco.

El agar BACARA es un medio cromogénico que posee alta selectividad y especificidad para el aislamiento y recuento de *B. cereus*, a su vez posee una validación internacional y su ahorro en tiempo y costos es de gran relevancia. Al ser un medio altamente selectivo confiere ventajas respecto a una fácil enumeración de las colonias, sin reacciones cruzadas, aun cuando la muestra presenta una alta carga de microbiota acompañante. También es un medio muy específico que se basa en un principio enzimático de la actividad de la fosfolipasa presente en *B.cereus* generando colonias de coloración rosa/naranja y un halo de opacidad producto de la actividad enzimática.

Selectividad

Empelando como microorganismo "No Target" *E. coli* ATCC 25922; se evidencio la ausencia de crecimiento del microorganismo visible mediante recuentos en todos los controles realizados. Esta información indica que el medio Selectivo bioMérieux BACARA Agar inhibe el desarrollo de microorganismos Gram negativos que puedan estar presentes como microbiota acompañante en una muestra real.

6.4.3.5 Control de Calidad Aerobic Count Plate PETRIFILM 3M

Productividad

El rendimiento y recuperación de *Bacillus cereus* ATCC 14579 como microorganismo aerobio mesófilo control positivo a través del crecimiento en el medio Petrifilm 3M Aerobic Count Plate se clasifica con un score de 2: Crecimiento bueno, en cuanto al crecimiento y características macroscópicas del medio en donde *B. cereus* tuvo un desarrollo macroscópico con colonias rojas típicas del crecimiento de aerobios mesófilos en este medio.

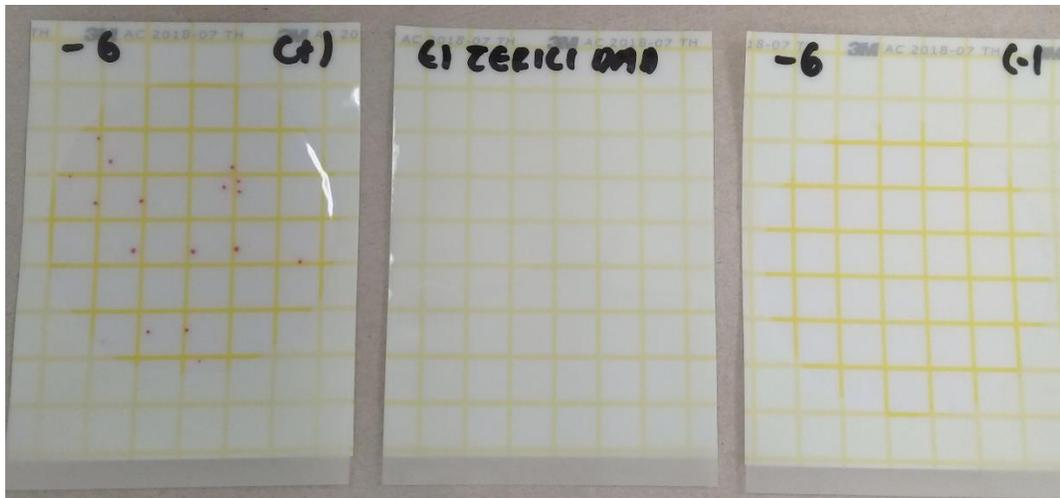


Imagen 33. Control de Calidad Petrifilm 3M Aerobic Count Plate. De izquierda a derecha Control positivo: *B. cereus* ATCC 14579: 17×10^6 UFC/mL, Prueba de esterilidad: Cumple y Control negativo: Agua Destilada Estéril: 0 UFC/mL.

A través de las placas de recuento aeróbico Petrifilm 3M provee un análisis que me permite determinar poblaciones totales de bacterias aerobios mesófilos en tan solo 48 horas. Cada placa contiene su agente gelificante, nutrientes y un indicador tinte rojo que colorea todas las colonias rojas para un mejor contraste y un conteo de las colonias más fácil. También es posible diferenciar con facilidad las partículas de alimentos opacos que pueden causar confusión cuando se usan otros métodos de recubrimiento.

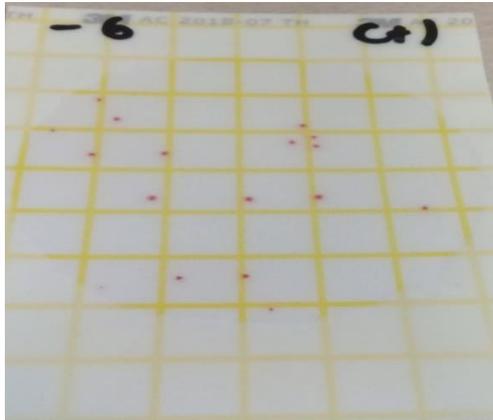


Imagen 34. *B. cereus* ATCC 14579 dilución 10^{-6} en medio Petrifilm 3M Aerobic Count Plate. Crecimiento típico con Colonias rojas positivas para aerobios mesófilos.

6.4.3.6 Control de Calidad Detección *Listeria monocytogenes*. VIDAS - LMX bioMérieux.

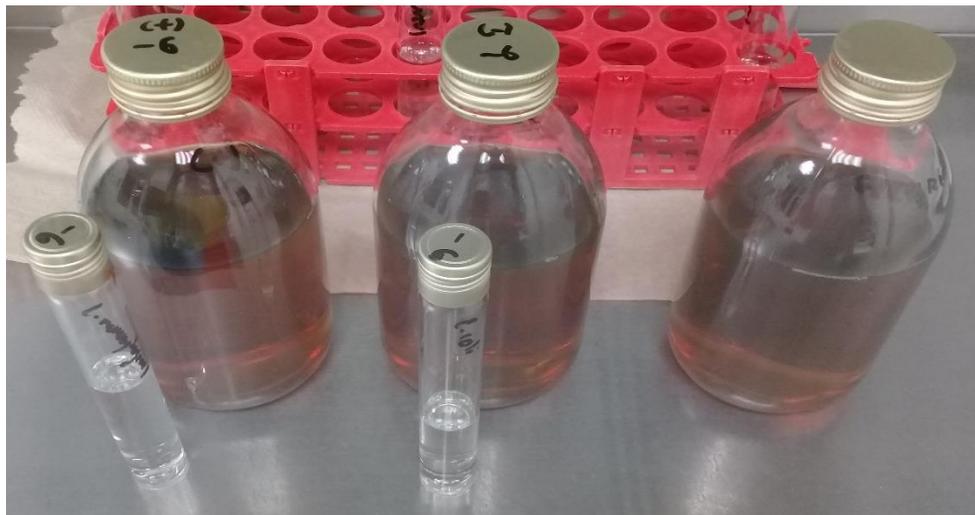


Imagen 35. Control de Calidad VIDAS – LMX bioMérieux. De izquierda a derecha Control positivo: *L. monocytogenes* ATCC 13932, Control negativo: *E. coli* ATCC 25922 y Prueba de esterilidad.

Productividad

El rendimiento y recuperación de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 como microorganismo control positivo a través del crecimiento en el caldo LMX-6F 225mL siendo un método cualitativo, se clasifica con un score de 2: Crecimiento bueno, se observó un óptimo desarrollo del microorganismo en este medio de cultivo que al ser sometido al análisis VIDAS LMX Express los resultados para todos los controles de Presencia.

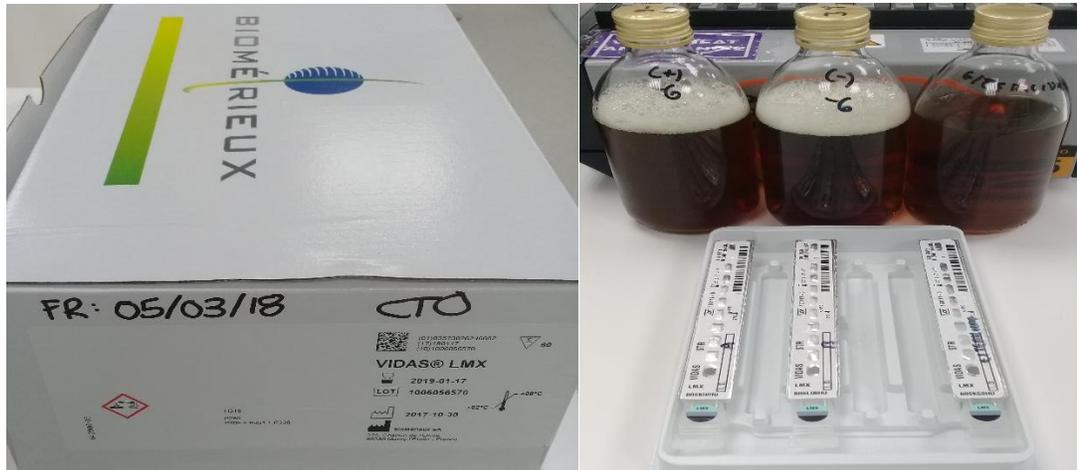


Imagen 36. Control de Calidad VIDAS-LMX. A la izquierda se observa el kit VIDAS a la derecha la adición de los 250uL de los controles en los cartuchos.



Imagen 37. Control de calidad VIDAS-LMX calentamiento a 131°C durante 5 minutos en heat and go. De izquierda a derecha, Control positivo: *L. monocytogenes* ATCC 13932, Control negativo: *E. coli* ATCC 25922 y Prueba de esterilidad.



Imagen 38. Control de calidad VIDAS-LMX. Montaje en el equipo VIDAS para iniciar el análisis. De izquierda a derecha, Control positivo: *L. monocytogenes* ATCC 13932, Control negativo: *E. coli* ATCC 25922 y prueba de esterilidad.

Alimentos Carnicos Planta Bogota

L. monocytogenes Xpress (LMX - BR) - DSVID R4.7.1 DSPTC R6.1

VIDAS : 1 - sección(s) 822
 Usuario : AnaMaria
 Número de lote : 190117-0

Terminada :
 09 may 2018 16:30:37

Estándar usado para este análisis :
 Terminada : 05 may 2018 10:34:31
 VRF S1 : 3499

		Negativo < 0.05		Positivo >= 0.05	
Posición	ID Muestra	Test BKG	VRF	Valor test	Interpretación

Nombre Espécimen :	Control Calidad +				
B-1	A	174	9917	2.83	Positivo
Nombre Espécimen :	Control Calidad -				
B-2	B	176	3	0.00	Negativo
Nombre Espécimen :	Esterilidad				
B-3	C	178	2	0.00	Negativo

Imagen 39. Resultado Control de calidad VIDAS-LMX posterior a los 80 minutos de análisis A. Control Positivo: *L. monocytogenes* ATCC 13932: Positivo, B. Control negativo: *E. coli* ATCC 25922: Negativo y C. Prueba de esterilidad: Negativo.

A través del Kit VIDAS *Listeria monocytogenes* Xpress (LMX) es posible la detección de *Listeria monocytogenes* en productos alimenticios con un enriquecimiento de 26 a 30 horas y un tiempo de análisis o ciclo VIDAS de 80 minutos. Así pues los resultados se obtienen al día siguiente del procesamiento de la muestra. Es un ensayo simplificado de dosis única. Se compone de un cartucho que contiene todos los reactivos necesarios para la detección listos al empleo y un cono (el SPR, del inglés Solid Phase Receptacle) recubierto de anticuerpos específicos para *L. monocytogenes*.

Selectividad

Empelando como microorganismo "No Target" *E. coli* ATCC 25922; se evidencio la ausencia de turbidez y crecimiento del microorganismo en el caldo de cultivo, a su vez al correr el análisis en VIDAS LMX Express fue ausente para todos los controles realizados. Esta información indica que el caldo LMX es un medio Selectivo para *L. monocytogenes* que inhibe microorganismos Gram negativos, también el método VIDAS es específico para la detección de *L. monocytogenes* por lo cual los anticuerpos presentes en los conos LMX son incompatibles con los antígenos presentes en *E. coli*.

6.4.3.7 Control de Calidad Detección *Salmonella* spp. VIDAS - APE bioMérieux



Imagen 40. Control de Calidad VIDAS–SPT bioMérieux. De izquierda a derecha Control positivo: *S. Typhimurium* ATCC 14028, Control negativo: *E. coli* ATCC 25922 y Prueba de esterilidad.



Imagen 41. Control de calidad VIDAS-SPT calentamiento a 131°C durante 5 minutos en heat and go. De izquierda a derecha, Control positivo: *S. typhimurium* ATCC 14028, Control negativo: *E. coli* ATCC 25922 y test de esterilidad.



Imagen 42. Montaje al equipo VIDAS. A. Control Positivo: *S. typhimurium* ATCC 14028, B. Control negativo: *E. coli* ATCC 25922 y C. Prueba de esterilidad.

Productividad

El rendimiento y recuperación de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 como microorganismo control positivo a través del crecimiento en el caldo BPW-F 225 mL siendo un método cualitativo, se clasifica con un score de 2: Crecimiento bueno, se observó un óptimo desarrollo del microorganismo en este medio de cultivo que al ser sometido al análisis VIDAS SPT los resultados para todos los controles fueron de Presencia.

Alimentos Carnicos Planta Bogota					
UP Salmonella (SPT - N8) - DSVID R4.7.1 DSPTC R6.1					
VIDAS : 1 - sección(s) 821			Terminada : 09 may 2018 15:33:04		
Usuario : AnaMaria					
Número de lote : 190316-0					
Estándar usado para este análisis :					
Terminada : 09 may 2018 14:25:12					
VRF S1 : 4744					
Negativo < 0.25			Positivo >= 0.25		
Posición	ID Muestra	Test	Valor test	Interpretación	
		BKG VRF			
Nombre Espécimen :	Control Calidad +				
A-1	A	158 10002	2.10	Positivo	
Nombre Espécimen :	Control Calidad -				
A-2	B	156 380	0.08	Negativo	
Nombre Espécimen :	ESTerilidad				
A-3	C	156 396	0.08	Negativo	

Imagen 43. Resultado Control de calidad VIDAS-STP posterior a los 48 minutos de análisis A. Control Positivo: *S. typhimurium* ATCC 14028: Positivo, B. Control negativo: *E. coli* ATCC 15922: Positivo y C. Prueba de esterilidad.

A través del Kit VIDAS *Salmonella* SPT que combina la tecnología de punta de proteína de fago p22 recombinante con la facilidad de uso del sistema VIDAS. Provee resultados confiables en menos de 19 horas; y ha sido validado para muestras de hasta 375g. Esta solución innovadora es rentable y a la vez permite ahorrar tiempo ya que su velocidad puede acelerar planes de acción correctivos en casos de contaminación.

Selectividad

Empleando como microorganismo "No Target" *E. coli* ATCC 25922; se evidenció la ausencia de turbidez y crecimiento del microorganismo en el caldo de cultivo, a su vez al correr el análisis en VIDAS STP fue ausente para todos los controles realizados. Esta información indica que el caldo BPW-F 225 mL es un medio Selectivo para el desarrollo de *Salmonella* que inhibe el crecimiento de otros microorganismos Gram positivos y Gram negativos diferentes a *Salmonella*, también el método VIDAS SPT es específico para la detección de *Salmonella spp.*

7. CONCLUSIONES

Se logró aplicar una técnica de conservación y mantenimiento para las 5 cepas de referencia siendo empleadas en el control de calidad de los métodos de análisis en el laboratorio de microbiología de una empresa productora de alimentos derivados cárnicos.

A través del mantenimiento y conservación de las cepas de referencia del laboratorio bajo transferencia periódica y refrigeración se encuentran los cultivos

viables y axénicos para el uso en el control de calidad de los métodos de análisis del laboratorio.

Por medio de la transferencia periódica se alcanzaron buenos resultados en cuanto a la nula variabilidad de las cepas en sus características fenotípicas; así como su metabolismo característico el cual no se ha sido afectado durante la conservación y el mantenimiento.

Se desarrolló un procedimiento para el control de calidad de los métodos de análisis del laboratorio dando confiabilidad y seguridad en los resultados emitidos por el laboratorio en su análisis microbiológico.

La técnica de transferencia periódica es una técnica muy susceptible a contaminaciones y cambios fenotípicos de las cepas, para su desarrollo debe emplearse un procedimiento adecuado el cual procure minimizar estas variables en los microorganismos en cuestión.

A la fecha 14/06/2018 y través de la técnica aplicada de conservación y mantenimiento, las cepas se encuentran viables, en cultivos puros y sin cambios en sus características fenotípicas y metabólicas.

8. REFERENCIAS

Alonso, S. (2016). Novel Food Fermentation Technologies. En S. Alonso, *Chapter 2. Novel Preservation Techniques for Microbial Cultures* (págs. 7-33). Switzerland: Springer International Publishing.

Amajoud, N., Soriano, J., Bracq, h., El Maadoudi, M., Skalli, N., Kounnoun, A., . . . Abrini, J. (2018). Prevalence of *Listeria spp.* and characterization of *Listeria* isolated from food products in Tetouan, Morocco. *Food Control*, 84, 436-441.

Centres for Disease Control and Prevention. (2013). *CDC*. Obtenido de An Atlas of *Salmonella* in the United States,1968-2011: <https://www.cdc.gov/salmonella/pdf/typhimurium-508c.pdf>

Centres for Disease Control and Prevention. (Septiembre de 2016). *CDC*. Obtenido de *Escherichia coli (E. coli)*: <https://www.cdc.gov/ecoli/pdfs/CDC-E.-coli-Factsheet.pdf>

Centres for Disease Control and Prevention. (19 de Octubre de 2016). *CDC*. Obtenido de Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Beef Products Produced by Adams Farm (Final Update): <https://www.cdc.gov/ecoli/2016/o157h7-09-16/index.html>

- Centres for Disease Control and Prevention. (19 de Julio de 2017). CDC. Obtenido de Human *Salmonella Typhimurium* Infections Linked to Exposure to Clinical and Teaching Microbiology Laboratories: <https://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-07-17/index.html>
- Centres for Disease Control and Prevention. (6 de Abril de 2018). CDC. Obtenido de Multistate Outbreak of *Salmonella Typhimurium* Linked to Chicken Salad (Final Update): <https://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-02-18/index.html>
- Deinhardt, S., Sachse, S., Geraci, J., Fischer, C., Kwetkat, A., Dawczynski, K., . . . Loffer, B. (2018). Virulence patterns of *Staphylococcus aureus* strains from nasopharyngeal colonization. *Journal of Hospital Infection*, 1-7.
- Frentzel, H., Thanh, M. D., Krause, G., Appel, B., & Mader, A. (2018). Quantification and differentiation of *Bacillus cereus* group species in spices and herbs by real-time PCR. *Food Control*, 83, 99-108.
- Gallego, A. (25 de Junio de 2014). Instituto Nacional de Salud. Obtenido de INFORME DEL EVENTO DE FIEBRE TIFOIDEA Y PARATIFOIDEA, HASTA EL PERIODO EPIDEMIOLÓGICO XIII, COLOMBIA, 2017: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/FIEBRE%20TIFOIDEA%20Y%20PARATIFOIDEA%20PE%20XIII_2017.pdf
- Gómez, O. (2014). Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* patógenas en Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 31(5), 577-586.
- Grutsch, A., Nimmer, P., Pittsley, R., & Mckillip, J. (2018). FoodBorne Diseases. En A. Grutsch, P. Nimmer, R. Pittsley, & J. Mckillip, *Chapter 7 – Bacillus spp. as Pathogens in the Dairy Industry* (págs. 193-211). Muncie, United States: Academic Press.
- Gutiérrez, J., Luna, L., Mendoza, M., Díaz, G. d., Burlete, J., & Feliciano, J. (2015). Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35, 95-102.
- Herrera, M., & Campos, M. (2005). Control de la Calidad para un Laboratorio de Microbiología. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños*, 40(1), 9-15.
- Herrero, A., & Elmerdhahl, J. (2018). *Salmonella Typhimurium* metabolism affects virulence in the host – A mini-review. *Food Microbiology*, 71, 98-110.

- Homolka, L. (2014). Preservation of live cultures of basidiomycetes - Recent methods. *Fungal Biology*, 118, 107-125.
- Hu, D. L., Wang, L., Fang, R., Okamura, M., & Ono, H. (2018). *Staphylococcus aureus*. Chapter 3 - *Staphylococcus aureus Enterotoxins* (págs. 39-55). Academic Press.
- Hunter, J., & Belt, A. (1996). Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry. En J. Hunter, & A. Belt, *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (págs. 15-19). Estados Unidos: Academic Press.
- INS. (20 de Marzo de 2017). *www.ins.gov.co*. Obtenido de Boletín Epidemiológico Semana 10: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2017%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2010.pdf>
- INS. (10 de Septiembre de 2017). *www.ins.gov.co*. Obtenido de Boletín epidemiológico Semana 37: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2017%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2037.pdf>
- INS. (24 de Diciembre de 2017). *www.ins.gov.co*. Obtenido de Boletín Epidemiológico Semana 52: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2017%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052.pdf>
- INS. (27 de Diciembre de 2015). *www.ins.gov.co*. Obtenido de Instituto Nacional de Salud: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2015%20Boletin%20epidemiologico%20Semana%2052.pdf>
- INS. (25 de Marzo de 2018). *www.ins.gov.co*. Obtenido de Instituto Nacional de Salud: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2013.pdf>
- INVIMA. (5 de Diciembre de 2014). Anexo 19 PO06-SS-402-P001. *Aseguramiento de la Calidad de los Resultados de Ensayos*. Colombia.
- INVIMA. (27 de Octubre de 2016). Anexo 22. PO06-SS-607-P001. *Aseguramiento de la Calidad de los Resultados*. Colombia.
- Jordan, K., & McAuliffe, O. (2018). *Listeria monocytogenes* in Foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, 83.

- Kobayashi, S., Malachowa, N., & DeLeo, F. (2015). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Abscesses. *The American Journal of Pathology*, 185(6).
- Kharchenko, N., Cherdynceva, T., & Netrusov, A. (2017). Development of Lyophilization Procedure Ensuring Survival of Bifidobacteria and Preservation of Their Probiotic Potential upon Long-Term Storage. *Microbiology*, 86(2), 209–216.
- Krumnow, A., Sorokulova, I., Olsen, E., & Globa, L. (2009). Preservation of bacteria in natural polymers. *Journal of Microbiological Methods*, 78, 189-194.
- Lopardo, H., Borgnia, D., & Mastroianni, A. (2012). Estudio de dos sistemas de transporte para mantener la viabilidad de bacterias de interés clínico. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 46(2), 229-232.
- López, R., Hernández, F., Bazán, E., & Castañon, L. (1999). Comparative study of two culture conservation methods in medical mycology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15, 471-474.
- Madden, R., Hutchison, M., Jordan, K., Pennone, V., Gundogdu, O., & Corcionivoschi, N. (2018). Prevalence and persistence of *Listeria monocytogenes* in premises and products of small food business operators in Northern Ireland. *Food Control*, 87, 70-78.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clarck, D. (2009). *Brook Biología de los Microorganismos*. Edición 12. (págs. 2-4). Madrid, España. Pearson.
- Microbiologics. (2012). Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release.
- Microbiologics. (5 de Julio de 2016). *MicroBioLogics, Inc.* Obtenido de MicroBioLogics:
http://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=530&c=915960&h=f0261b9ecb4cb8f6a9c&_xt=.pdf
- Ministerio de Salud y Protección Social. (13 de Junio de 2011). *MINSALUD*. Obtenido de Caso de bacteria E. Coli en Montería no es de la misma cepa del brote que se está presentando en Europa:
<https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Caso-de-bacteria-E.-Coli-en-Monter%C3%ADa-no-es-de-la-misma-cepa-del-brote-que-se-est%C3%A1-presentando-en-Europa.aspx>
- Ministerio de Salud y Protección Social (2011). *MINSALUD*. Obtenido de Perfil de riesgo *Bacillus cereus* en alimentos listos para consumo no industrializados:

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Perfil-bacillus-cereus.pdf>

- Mirhoseinia, A., Amania, J., & Naza, S. (2018). Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. *Microbial Pathogenesis*, 117, 162-169.
- Morgan, C., Herman, N., White, P., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods* 66, 66, 183–193.
- Muñoz, Á., Chaves, J., Rodríguez, E., & Realpe, M. (2013). Listeria monocytogenes en manipuladores de alimentos: un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria. *Biomédica*, 33(2), 283-281.
- Muñoz, A., Vargas, M., Otero, L., Díaz, G., & Guzmán, V. (2011). Presencia de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. *Biomédica*, 31, 428-439.
- Ortiz, T., Ocampo, V., Prada, L., & Franco, M. (2016). Métodos de conservación para actinobacterias con actividad solubilizadora de fósforo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 32-39.
- Overmann, J., Abt, B., & Sikorski, J. (2017). Present and Future of Culturing Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 71, 711-30.
- Prakash, O., Nimonkar, Y. N., & Shouche, Y. (22 de Noviembre de 2012). MINIREVIEW. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS, Microbiologu Letters*, 339, 1-9.
- Puentes, S., & Dustan, M. (2018). *Escherichia coli* Complications in Pediatric Critical Care. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 30(1).
- Rodriguez, E., Diaz, P., Moreno, J., Bautista, A., Montañó, L., Realpe, M., . . . Wiesner, M. (2017). Vigilancia por laboratorio de *Salmonella enterica* en casos clínicos humanos en Colombia 2005 a 2011. *Enfermedades infecciones y microbiología clinica*, 35(7), 417-425.
- Sánchez, J., Correa, M., & Castañeda, L. (2016). *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 34(2), 230-242.

- Savran, D., Pérez, F., & Halkman, K. (2017). Modeling the survival of *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* during the fermentation of yogurt. *Food Science and Technology International*, 24(2), 110-116.
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P., & Bremer, P. (2018). Impact of temperature, nutrients, pH and cold storage on the germination, growth and resistance of *Bacillus cereus* spores in egg white. *Food Research International*, 106, 394-403.
- Stevenson, R., & Hatt, H. (1992). Culture Collection , Functions. Encyclopedia of Microbiology Academic Press, p 615 - 619. En R. Stevenson, & H. Hatt, *Culture Collection , Functions. Encyclopedia of Microbiology* (págs. 615-619). Academic Press.
- Safronova, N. N. (1996). Comparison of two methods for root nodule bacteria. *Journal of Microbiological Methods* , 24, 231-237.
- Vanegas, M., Moreno, J., Ramos, V., Chirivi, J., Garzón, A., Arévalo, S., . . . Baquero, C. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Colombian foods. *BIO*, 2, 61-67.
- Weng, Z., Díaz, O., & Molina, I. (2005). Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer?. *Revista Cubana Higiene y Epidemiología*, 43(3), 1-4.
- WFCC. (2010). *RECOMENDACIONES PARA EL ESTABLECIMIENTO Y FUNCIONAMIENTO DE COLECCIONES DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS* . Federación Mundial de Colecciones de cultivo. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología

